

Aus Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATION

**Kontrastmittel-Videodensitometrie und
Automatisierte Mikroskop-Bildanalyse
zur Messung der Durchblutung und
Vaskularisation
von Mammakarzinomen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Frauenheilkunde und Geburtshilfe

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dr. Jens-Uwe Blohmer
aus Rostock

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Jonat, Kiel
2. Prof. Dr. med. F. Degenhardt

Habilitation eingereicht: 06.10.1999
Datum der Habilitation: 13.06.00

Zusammenfassung

Es wurde überprüft, ob sich Zusammenhänge zwischen der Tumordurchblutung und Vaskularisation nachweisen lassen, ob Unterschiede in der Durchblutung zwischen malignen und benignen Herdbefunden der Brust gemessen werden können, ob sich aus der Tumordurchblutung und Vaskularisation Aussagen zur Prognose der Patientin ableiten lassen und ob sich die Durchblutung und Vaskularisation unter der präoperativen Chemotherapie bei Mammakarzinomen ändert. Die CD war im direkten Vergleich nicht der Mammographie und der konventionellen B-Bild-Mammasonographie überlegen. Mit verschiedenen Parametern der Kontrastmittel-Videodensitometrie, wie die Zeiten bis zum maximalen Signalanstieg (T_{\max}) mit dem Kontrastmittel Levovist[®], konnte mit einer Spezifität von bis zu 92% sicher zwischen benignen und malignen Herdbefunden unterschieden werden. Mit der Videodensitometrie war es im Gegensatz zum konventionellen CD möglich, Veränderungen der Durchblutung von Mammakarzinomen unter einer präoperativen Chemotherapie durch die Änderung der Kontrastmittelkinetik zu erkennen. Bei den kleinlumigen Gefäßen korrelierten gefäßmorphologische Parametern mit den klassischen Prognoseparametern (Lymphknotenstatus) und der Durchblutung. Selbst unter einer effektiven Chemotherapie, die auch zu einer histologischen Regression geführt hat, veränderten sich die Vaskularisationsparameter nicht signifikant.

Schlagwörter:

Mammakarzinom, Durchblutung, Vaskularisation, Videodensitometrie

Abstract:

Various qualitative and semi-quantitative blood flow and vascularisation parameters were analyzed for their value in the fields of differential diagnosis, evaluation of prognosis, and of monitoring over the time of preoperative chemotherapy. Color Doppler sonography was not superior to other diagnostic methods for preoperative and prognostic assessment of a breast lesion. In contrast agent videodensitometry the values for T_{\max} were significantly higher for benign breast than for breast cancer. The combination of contrast agent and subsequent video-densitometry would be able to increase the specificity (92% in this investigation) of the diagnosis of breast cancer. Color Doppler can be used to image the blood supply in the smaller blood vessels. The vascularization and the blood flow of a breast carcinoma permits conclusions to be drawn as to the metastatic lymph-node status of a patient. There were only minimal changes of vascularisation visible even in patients with histological regression of breast cancer after preoperative chemotherapy.

Keywords:

Breast cancer, blood flow, vascularisation, videodensitometry

**Für
Heike, Karl und Martin**

Inhalt

1	Einleitung	7
1.1	Angiogenese, Tumervaskularisation, Tumordurchblutung und Hypoxie des Mammakarzinoms	7
1.2	Die Erkennung, Differentialdiagnose, Prognoseeinschätzung und das Therapiemonitoring von Mammakarzinomen mit bildgebenden Verfahren	9
1.2.1	Erkennung und Differentialdiagnose von Mammakarzinomen	9
2	Zielstellung der Arbeit	15
3	Patientinnen und Methoden	16
3.1	Farbdopplersonographie (CD)	16
3.1.1	Differentialdiagnose und Farbdopplersonographie	16
3.1.2	Prognose und Farbdopplersonographie	19
3.1.3	Vergleich der Farbdopplersonographie mit der Magnetresonanztomographie (MRT) in der Differentialdiagnose von Mammatumoren	19
3.1.4	Therapiemonitoring und Farbdopplersonographie	20
3.2	Ultraschall-Kontrastmittelsonographie (Videodensitometrie)	21
3.2.1	Color Power Angiomode (CPA) im Vergleich zur Farbdopplersonographie (CD)	21
3.2.2	Differentialdiagnose mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie	21
3.2.3	Therapiemonitoring mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie	26
3.3	Tumervaskularisation und automatisierte Mikroskop-Bildanalyse (AMBA)	27
3.3.1	Vergleich der Tumordurchblutung mit der morphometrisch bestimmten Tumervaskularisation	27
3.3.2	Prognose und Tumervaskularisation	29
3.3.3	Therapiemonitoring und Tumervaskularisation	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Farbdopplersonographie (CD)	32
4.1.1	Differentialdiagnose und Farbdopplersonographie (aus Blohmer et al. 1999 (39))	32
4.1.2	Prognose und Farbdopplersonographie (aus Blohmer et al. 1998 (130))	34
4.1.3	Vergleich der Farbdopplersonographie mit der Magnetresonanztomographie (MRT) in der Differentialdiagnose	37
4.1.4	Therapiemonitoring und Farbdopplersonographie	39
4.2	Ultraschall-Kontrastmittelsonographie (Videodensitometrie)	40
4.2.1	Color Power Angiomode (CPA) im Vergleich zur Farbdopplersonographie (CD)	40
4.2.2	Differentialdiagnose mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie	41
4.2.3	Therapiemonitoring mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie	44
4.3	Tumervaskularisation und automatisierte Mikroskop-Bildanalyse (AMBA)	47
4.3.1	Vergleich der Tumordurchblutung mit der morphometrisch bestimmten Tumervaskularisation	47
4.3.2	Prognose und Tumervaskularisation	52

4.3.3	Therapiemonitoring und Tumorvaskularisation	54
5	Diskussion	61
5.1	Farbdopplersonographie (CD)	61

1 Einleitung

1.1 Angiogenese, Tumervaskularisation, Tumordurchblutung und Hypoxie des Mammakarzinoms

Angiogenese, Tumervaskularisation, Tumordurchblutung und Hypoxie sind vier Merkmale eines Karzinoms, die komplex miteinander verbunden sind. Der Zusammenhang zwischen Tumordurchblutung und Metastasierung wurde schon 1907 beschrieben (1).

Die Tumorangio-genese ist die Neubildung von Blutgefäßen innerhalb des Tumors ab einem Tumolvolumen von größer als 1-2 mm³ oder ab ca. 10⁶ Tumorzellen (2,3). Die Tumorzellen können (pro-) angiogenetische und antiangiogenetische Faktoren bilden wie das Angiostatin und Thrombospondin. Angiogenese-Inhibitoren werden ab einer TumorgroÙe von ca. 10⁹ Tumorzellen in größerer Menge gebildet (4). Das Gleichgewicht dieser Faktoren und zwischen Tumorproliferation und Apoptose führen zu einem Stillstand des Wachstums des Primärtumors und seiner Metastasen („dormancy“ (5)). Die Störung dieses Gleichgewichts („angiogenic switch“) führt zur Angiogenese und zum Wachstum des Primärtumors und seiner Metastasen (6a). Dieser angiogenic switch kann durch Hypoxie aktiviert und durch Onkogene wie das mutierte ras-Gen oder p53-Mutationen ausgelöst und verstärkt werden. Zellen mit einem mutierten ras-Gen reagieren auf die Hypoxie mit einer stärkeren Synthese der angiogenetischen Faktoren wie dem vascular endothelial growth factor (VEGF (6b)). Eine p53-Mutation kann mit einem Verlust des Angiogenese-Inhibitors Thrombospondin und einer verstärkten Synthese von VEGF assoziiert sein (7). Ein hypoxisches Milieu führt wieder bevorzugt zu einer Selektion des mutierten p53 (8).

Mehr als 14 Angiogenese-Faktoren sind bekannt, zu den wichtigsten zählen die durch die Tumorzellen synthetisierten Mitogene (Proteoglykane) wie der basic fibroblastic growth factor (bFGF) und die vascular endothelial growth factors (VEGF 1-3 (9)), Proteasen wie Matrix Metalloproteinasen aus der Extrazellulärmatrix und Zell-Adhäsionsmoleküle der Integrin-Familie und Wachstumsfaktoren. Die Überexpression der angiogenetischen Faktoren während des angiogenic switch wird durch die Extrazellulärmatrix aktiviert (10) oder durch die vom Tumor induzierten Makrophagen (VEGF 1) selbst vorgenommen (11). Gleichzeitig kommt es zu einer Downregulation der Angiogenese-Inhibitoren wie Thrombospondin, das u.a. von normalen Fibroblasten und vom p53-Wildtyp reguliert wird (12). Die Synthese von VEGF durch die Tumorzellen wird während und nach der Transkription u.a. durch die Wirkung des hypoxia inducible factor (hif)-1a induziert. Dieses eine Porphyrinstruktur enthaltende Protein wird durch Phosphorylierung unter Hypoxie aktiviert, bindet sich an Hypoxie regulierende Elemente (HRE) an der DNA und induziert damit u.a. die Synthese des Zytokins VEGF (13). Durch diese unter Hypoxie aktivierten und synthetisierten Faktoren kommt es zur Ausbildung spezifischer TumorgefäÙe. Die Endothelzellen besitzen mindestens 3 verschiedene VEGF-Rezeptoren (Tyrosin-Kinasen (14)). Deren Lumen entsteht zunächst aus Vakuolen, die sich aus dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum entwickeln, innerhalb der Endothelzellen. Ein zweiter Weg ist die Protrusion von Teilen (Pseudopodien) benachbarter Endothelzellen, die sich aneinander lagern und so ein Lumen entstehen lassen. Für diese Entwicklung bedarf es einer aktiven Endothelmigration und angiogener Stimuli. Nur ca. zwei Drittel dieser Frühformen entwickeln sich weiter zu TumorgefäÙen. Die Endothelzellen verändern sich durch Abflachen und Abnahme der Zellorganellen. Damit wird das GefäÙlumen größer. Ab wann sich eine Basalmembran bildet, ist noch nicht eindeutig geklärt. Schließlich erhalten diese neu gebildeten TumorgefäÙe Anschluß an den präformierten GefäÙbaum (15).

Die TumorgefäÙe weisen einige Besonderheiten auf: Sie bestehen nur aus Endothelzellen und einer porösen Basalmembran, sie haben keine Media (keine glatte Muskulatur). Durch diese Membranlücken kommt es zu Extravasaten. Die Extravasation wird außerdem durch VEGF, auch Vascular permeability factor (VPF) unterstützt (14). Die Extravasation, unter anderem von Fibrin ist die Voraussetzung für die Bildung des für das Tumorstromas notwendigen Tumorstromas.

Der Aufbau des GefäÙbaumes ist nicht hierarchisch. Typisch sind Kalibersprünge und GefäÙabbrüche und sinusoidale Plexus ebenso wie arterio-venöse Shunts. Bereiche mit einer hohen GefäÙdichte liegen neben Arealen mit wenigen TumorgefäÙen.

TumorgefäÙe haben keine Nervenversorgung und keine umgebenden LymphgefäÙe, keine Differenzierung in Venen und Arterien (15,16). Der hydrostatische Druck innerhalb des Tumors ist deshalb hoch (im Tumor 45 mm Hg, im normalen Gewebe 5-20 mm Hg (17)). Aufgrund dieser Druckdifferenz fließt die interstitielle Flüssigkeit radiär vom Tumorzentrum zur Tumorpheripherie und bedingt das peritumoröse Ödem (16). Der GefäÙwiderstand ist aufgrund der GefäÙform (archaisch), der wechselnden GefäÙdurchmesser und des hohen hydrostatischen Druckes hoch, trotz einer Vielzahl von TumorgefäÙen (18). Zwischen den TumorgefäÙen ist der interstitielle Raum groß, es resultiert eine lange Diffusionsstrecke. Die Blutversorgung innerhalb des Tumors ist heterogen (18).

Die Folge dieses Tumorgefäßaufbaus ist wiederum die Gewebshypoxie, die zu einer weiteren VEGF-Synthese führt.

Die Endothelzellen selbst synthetisieren ebenfalls Wachstumsfaktoren und Zytokine, die das Wachstum und die Migration der Tumorzellen stimulieren (Parakriner Effekt) wie insulin-like growth factor I und II (IGF-1 und -2), basic fibroblastic growth factor (bFGF), interleucin-6 und interleucin-8 (IL-6 und -8). IL-6 stimuliert z.B. die Motilität der Mammakarzinom-Zellen und ermöglicht damit ihre Invasion in das Gefäßsystem und damit in die Blutzirkulation (19,20,21). Die gegenseitige metabolisch-nutritive und parakrine Beeinflussung der Tumorzellen und Endothelzellen wird von Folkman (22) als „two-cell compartment-model of a tumor“ beschrieben. Harris hat diesen Zusammenhang während eines Vortrages auf dem 21st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium am 15. Dezember 1998 graphisch dargestellt (Abbildung 1 (23)).

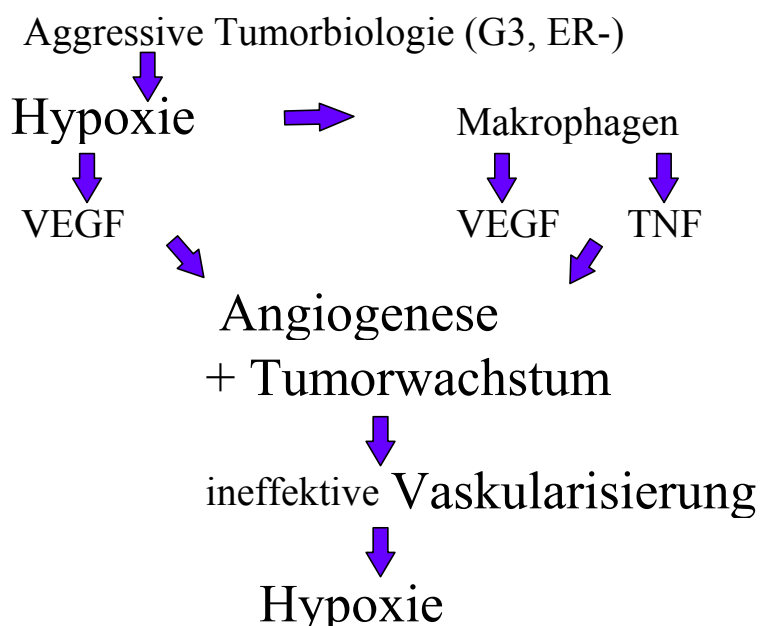


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen Angiogenese, Hypoxie und Vaskularisierung (modifiziert nach Harris 1998 (23))

Durch diesen Zusammenhang zwischen Angiogenese und Tumorwachstum kann durch die Gabe von antiangiogenetisch wirkenden Substanzen das Wachstum des Tumors gehemmt werden. Außerdem können durch die dann veränderte Vaskularisation und den geringeren hydrostatischen Druck Chemotherapeutika oder antitumoral wirksame Hormone leichter zu den Tumorzellen diffundieren und dort wirken (24).

Der vierte Faktor in diesem System ist die Durchblutung. Sie wird maßgeblich durch die Form der Blutgefäße beeinflusst, hier von den Tumorgefäßen (arterio-venöse Shunts, hoher Gefäßwiderstand durch hohen hydrostatischen Druck usw.). Aus den bekannten experimentellen Untersuchungen kann der Blutfluß in malignen Tumoren wie folgt charakterisiert werden (25): Der Blutfluß kann innerhalb gleicher Primärtumoren, Tumorstadien und histologischer Klassifikationen variieren. Die Blutflußrate im Tumor kann so hoch wie in Organen mit einer hohen Metabolisierungsrate wie dem Herz, der Leber oder dem Gehirn sein. Es ist aber auch ein Blutfluß wie in gering metabolisierten Organen wie der Haut, dem ruhenden Skelettmuskel oder dem Fettgewebe möglich. Der Tumorblutfluß ist unabhängig vom Blutfluß im umgebenden Gewebe. Er ist z.B. im Mammakarzinom höher als im postmenopausalen Mammagewebe und niedriger als in der laktierenden Mamma. In einigen malignen Tumoren ist der Blutfluß in der Tumorperipherie höher als im Tumorzentrum, bei anderen Tumoren ist der Blutfluß im Zentrum höher als in der Peripherie.

Mit der Laser Doppler Flowmetrie ließen sich zeitliche Unterschiede des Blutflusses im mikroskopischen Level der Tumoren nachweisen (26). Der Tumorblutfluß zeigt ebenso wie die

Tumervaskularisation eine positive Korrelation zur VEGF-Expression. Er hängt im Unterschied zur Durchblutung im gesunden Gewebe nicht von metabolischen Erfordernissen ab. Die Unterschiede im Blutfluß innerhalb eines Tumors sind geringer als die zwischen verschiedenen Tumoren. Die Unterschiede des Blutflusses innerhalb des Tumors sollen mit den Unterschieden innerhalb der Gefäßdichte korrelieren (27).

Die zeitliche Veränderung der Durchblutung (Nur 25-85% des Tumors sind permanent durchblutet (16).) der Tumoren zu messen, gelang bisher nur annähernd experimentell. In vivo ist dies erst seit ca. 10 Jahren mit der Einführung von diagnostischen Geräten mit einer ausreichend hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung, wie der dynamischen Magnetresonanztomographie (dMRT), der dynamischen Computertomographie (dCT (28)), der Positronen Emissions Tomographie (PET (29)), und der Color-Dopplersonographie (CD (30)) möglich. Die CD ermöglicht die Darstellung von Flüssen von unter 0,001 ml/sek. (31). Mit dieser Methode kann die Geschwindigkeit und der periphere Widerstand und deren Veränderungen des intravasalen Blutflusses tomographisch und in „Echt-Zeit“ festgestellt werden. Durch aufgrund ihrer Molekülgröße intravasal verbleibende Kontrastmittel kann diese intravasale Darstellung eventuell noch verbessert werden (32). Bei der MRT-Untersuchung der Durchblutung von Mammatumoren muß die Hyperpermeabilität von Tumorgefäßen und die damit verbundene extravasale Anreicherung von Kontrastmittel im Interstitium als Folge der Neoangiogenese neben der intravasalen Kontrastmittelkinetik in Betracht gezogen werden (33,34). Durch die Messung der Durchblutung von Mammakarzinomen sollte eine Kontrolle der Wirkung antiangiogenetischer und antitumoröser Therapien möglich sein.

1.2 Die Erkennung, Differentialdiagnose, Prognoseeinschätzung und das Therapiemonitoring von Mammakarzinomen mit bildgebenden Verfahren

1.2.1 Erkennung und Differentialdiagnose von Mammakarzinomen

Die Voraussetzung für die Messung der Tumordurchblutung ist eine hohe Sensitivität dieses Verfahrens in der Erkennung und Möglichkeit der Darstellung des Blutflusses im zu untersuchenden Herdbefund. Bei den ultraschallgestützten Verfahren muß dieser Herdbefund zunächst mit der konventionellen Mammasonographie aufgefunden werden. Danach interessiert die Rate der erkannten und als suspekt eingestuft Blutflüsse in diesem sonographischen Herdbefund. Diese beiden Schwerpunkte waren die Zielkriterien der ersten Studien im Rahmen der vorgestellten Habilitationsschrift.

Bei der Beurteilung eines diagnostischen Verfahrens muß zwischen seinem Einsatz im Screening, in der Differentialdiagnose, in der Einschätzung der Prognose oder im Therapiemonitoring unterschieden werden. Für die Differentialdiagnostik müssen die Spezifität und der positive Vorhersagewert (positive predictive value, ppv) hoch sein, um z.B. unter den im Mammographie-Screening entdeckten suspekten Herdbefunden die benignen Läsionen zu erkennen und deren unnötige Operation zu vermeiden (35-38).

In einer Studie, die an der Frauenklinik der Charité zum Vergleich der bildgebenden Verfahren in der präoperativen Differentialdiagnostik von März 1993 bis zum Mai 1995 an 200 Patientinnen (Charakteristik der untersuchten Herdbefunde in Tabelle 1) durchgeführt wurde (39), hatte die hochauflösende Mammasonographie die höchste Sensitivität und Spezifität in der Erkennung des Mammakarzinoms (Tabelle 2). Diese Angaben sind eine Gegenüberstellung der Methoden, lassen aber keinen direkten Vergleich zu. Dieser wurde in dieser Studie mit der multivariaten Diskriminanzanalyse durchgeführt. An erster Stelle in der präoperativen diagnostischen Effektivität lag die Mammasonographie.

Es sollte also mit der Mammasonographie gelingen, 95% aller malignen Herdbefunde präoperativ aufzufinden (Sensitivität 95%). Die Methoden, welche die Tumordurchblutung zur Differentialdiagnostik nutzen, wie die MRT und die CD hatten ebenfalls eine akzeptable Sensitivität von 90 bzw. 82 % aber eine Spezifität (63 bzw. 75%), die zur Differentialdiagnostik nicht akzeptabel ist (Tabelle 2). Methodische Verbesserungen sind hier notwendig. Ob diese mit der Ultraschallkontrastmittel-unterstützten Videodensitometrie möglich sind, wird in dieser Habilitationsschrift beantwortet werden (Abschnitt 4.2.2).

Tabelle 1: Postoperative histologische Befunde der präoperativ mit Mammographie, Mammasonographie, Farbdopplersonographie und Mamma-MRT (MRM) untersuchten Patientinnen (aus Blohmer et al. 1999 (39))

Histologischer Typ	Anzahl
Alle Mammakarzinome	99
Invasive duktale Karzinome	79
Invasive lobuläre Karzinome	11
Intraduktale Karzinome	4
Muzinöse Karzinome	2
Medulläre Karzinome	2
Großzelliges Karzinom	1
Alle benignen Herdbefunde	101
Proliferative und nichtproliferative Mastopathie	41
Atypische duktale Hyperplasie	12
Fibroadenome	34
Sklerosierende Adenosen	7
Adenome	3
Mastitis nonpuerperalis	2
Neurofibrom	1

Tabelle 2: Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert (ppv) und negativer prädiktiver Wert (npv) für jede diagnostische Methode für die gegebene Prävalenz des Mammakarzinoms (aus Blohmer et al. 1999 (39))

Diagnostische Methode	Anzahl der Patienten mit eindeutiger Diagnose/ Anzahl untersuchter Patientinnen	Sensitivität	Spezifität	Prävalenz	ppv	npv
Mammographie	158/166	0,85 (68/80)	0,77 (60/78)	0,5	0,79	0,83
Mamma-sonographie	168/173	0,95 (76/80)	0,8 (70/88)	0,48	0,81	0,94
Color Doppler	150/157	0,82 (58/71)	0,75 (59/79)	0,47	0,72	0,84
MRT	68/68	0,90 (37/41)	0,63 (17/27)	0,6	0,79	0,63

Für die Erkennung von Herdbefunden nutzt der Untersucher die spezifischen Interaktionen der Ultraschallwellen mit den malignen Herdbefunden aus. Die Ultraschallwellen des B-Bildes (von brightness: Grauwertabstufung des zweidimensionalen Echtzeit-Ultraschall-Bildes) werden von stromareichen Mammakarzinomen in typischer Weise absorbiert, reflektiert, gestreut, gebeugt und gebrochen (40-42). Es resultieren typische sonographische Phänomene, mit denen man Herdbefunde sicher (Tabelle 2) erkennen und sie als malignitätsverdächtig einstufen kann. Die gleichen Phänomene gelten auch für die dreidimensionale B-Bild-Sonographie (43,44). Die diagnostische Wertigkeit jedes einzelnen Merkmals kann durch die odds-Ratio (Maß für das relative Risiko für das

Vorliegen eines Mammakarzinoms, wenn dieses Merkmal vorhanden ist, Tabelle 3), die Sensitivität und Spezifität für die Erkennung des Karzinoms angegeben werden (45,46).

Tabelle 3: Sonographische B-Bild-Dignitätskriterien und die berechnete Sensitivität, Spezifität, der positive prädiktive (ppv) und negative prädiktive Wert (npv) und die odds-Ratio (aus Blohmer et al. 1997 (46))

Ultraschallkriterium	S e n s	S p e z	p p v	n p v	Odds- ratio
Echogenität	8 1 , 5	9 , 4	2 9	5 2 , 6	0,45
Binnenechos	2 9 , 9	6 2	2 6 , 4	6 6	0,69
Tumorachse	7 9 , 4	5 3	4 3 , 5	8 4 , 9	4,4
Randwall	9 2 , 8	9 6 , 7	9 2 , 8	9 6 , 7	378
Laterale Randschatten	9 6 , 9	6 1	5 3 , 1	9 7 , 7	49
Architektur	8 8 , 7	9 6 , 7	9 2 , 5	9 4 , 9	230
Deformierbarkeit	9 2 , 8	7 0 , 4	5 8 , 8	9 5 , 5	31
Dorsale Schallabschwäch.	7 6 , 3	7 6 , 5	5 9 , 7	8 7 , 6	10

Ein anderer Weg die typischen Veränderungen, welche die Ultraschallwellen erhalten, wenn sie auf ein Mammakarzinom treffen und die sich letztlich in verschiedenen Abstufungen und Mustern der Grauwerte des Ultraschallbildes äußern, ist die Texturanalyse des B-Bildes (47). Diese Methode ist weitestgehend unabhängig von der subjektiven Beurteilung des Ultraschallbildes und hat sicher Zukunft in der Differentialdiagnose von Herdbefunden der Mamma mit dem Ultraschall. In der Dopplersonographie wird die Eigenschaft der Schallwellen genutzt, ihre Frequenz zu ändern,

wenn sie auf ein bewegtes, echogenes Medium treffen.

Die Kodierung der Frequenzverschiebung der Ultraschallwellen in Form der Dopplerhüllkurve

($V \text{ (m/s)} = fD \text{ (Hz)} \times c \text{ (m/s)} / f_0 \text{ (Hz)} \times 2 \times \cos \alpha$;

fD : Frequenzverschiebung, c : Schallgeschwindigkeit, f_0 Frequenz des Dopplerschallkopfes, α : Winkel der Schallwellen zum Blutgefäß oder auch Dopplerwinkel)

beim gepulsten Spektraldoppler erlaubt die Wiedergabe quantitativer Flußmerkmale wie der systolischen Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}), der enddiastolischen Geschwindigkeit (V_{\min}) und der Indizes für den peripheren Gefäßwiderstand, wie den Resistance Index ($RI = V_{\max} - V_{\min} / V_{\max}$) und den Pulsatilitäts-Index ($PI = V_{\max} - V_{\min} / V_{\text{mean}}$) von Flüssen in ausgewählten Gefäßen (Abbildung 2).

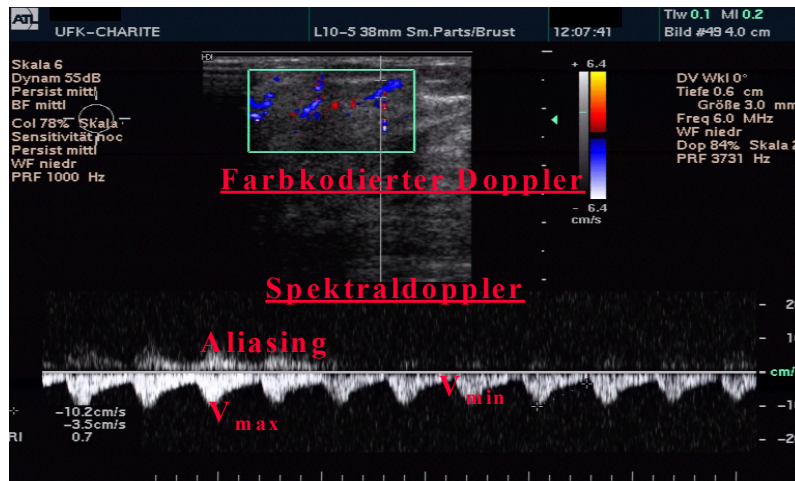


Abbildung 2: Farbkodierte Dopplersonographie in der oberen Bildhälfte und Dopplerflußkurve des gepulsten Spektraldopplers in der unteren Bildhälfte. Eingezeichnet sind V_{\max} , V_{\min} und das Aliasing-Phänomen

(Aliasing-Phänomen: Die PRF ist nicht mindestens doppelt so hoch wie die maximal zu messende Dopplerfrequenz. Geschwindigkeiten oberhalb des durch die PRF gesetzten Limits werden nicht mehr korrekt erfaßt und unterhalb der Nulllinie, also in einem anderen Kanal, dargestellt (48).).

Die Kodierung der Frequenzverschiebung der Flüsse in diesen Gefäßen in Farbe und in einer größeren Fläche (durch die Verwendung vieler sample volumes entlang der Schallwellenachse im gepulsten Farbdoppler) erlaubt Aussagen zur Lokalisation dieser Blutflüsse im Herdbefund, zur Blutflußrichtung, zur Bildung von Turbulenzen, jedoch nur eingeschränkt zur Flußgeschwindigkeit. Außerdem gelingt die Ableitung von Dopplerflußkurven des gepulsten Spektraldopplers optimal, da das Meßfenster (sample volume) in einem möglichst spitzen Winkel in den zu untersuchenden, jetzt farbig sichtbaren, Fluß gelegt werden kann. In der vorliegenden Habilitationsschrift werden häufig beide Untersuchungsmethoden, da sie den gepulsten Doppler als Grundlage haben und einander bedingen als Farbdoppler (Color Doppler, CD) zusammengefaßt. Die Ergebnisse der beiden Verfahren des gepulsten Dopplers (quantitative Ergebnisse des gepulsten Spektraldopplers vs. qualitative oder semiquantitative Ergebnisse des gepulsten und farbkodierten Dopplers) werden jedoch getrennt untersucht und dargestellt.

Im CPA werden äquivalent zu den Graustufen der Spektraldopplerkurve die Amplituden des reflektierten Ultraschalls farbkodiert. Ein Synonym für diese Art der Ultraschalluntersuchung ist deshalb auch „Amplituden kodierter Doppler“. Die Amplitude wird durch die Anzahl der fließenden Blutkörperchen (in erster Linie Erythrozyten) bestimmt. Um Gewebs- und Flußamplituden voneinander zu unterscheiden, wird nur ein gering von 90 Grad zur Blutflußrichtung abweichender Winkel des Ultraschalls benötigt. CPA ist damit nahezu winkelunabhängig. Kalkulationen unter Einschluß des Dopplerwinkels wie im Farbdoppler sind nicht notwendig. Theoretisch müßte die CPA aufgrund der höheren Frequenz der ausgesendeten Schallwellen (10 MHz vs. 6 MHz beim Farbdoppler) empfindlicher bei der Darstellung langsamer Flüsse sein. Außerdem gelingt die Darstellung langsamer Flüsse in kleinen Gefäßen, die senkrecht zu den Schallwellen verlaufen. Dadurch wird, ähnlich wie in der Angiographie, eine im Vergleich zum Farbdoppler „kräftige“ und farbige Darstellung des Blutflusses in nahezu dem gesamten Gefäßbett möglich. Die Bezeichnung dieser Technologie ist

deshalb auch „Color Power Angiography“ oder „Power Doppler“ oder „Color Power Angiomode (CPA)“.

Für die Verbesserung des intravasalen Ultraschallsignals ist das Ultraschallkontrastmittel (USKM) Levovist® (Schering AG, Berlin) seit 1996 in Deutschland zugelassen. Ein optimales Kontrastmittel muß eine hohe Echogenität wie z.B. Luft haben und aufgrund einer kleinen Partikelgröße bis in die Kapillarregion gelangen können. Eine Stabilisierung dieser freien Mikrobläschen ist notwendig, da freie Mikrobläschen sehr schnell zerfallen. Levovist® ist deshalb eine mikrokristalline Suspension aus 99,9% Galactose und 0,1% Palmitinsäure mit eingeschlossenen Luftbläschen, die nach Mischen und Aufschütteln der Substanz mit physiologischer Kochsalzlösung entstehen. Beide Stoffe sind natürliche Nahrungsbestandteile. Sie werden nach oraler Aufnahme bis auf den seltenen Fall einer Galactosämie problemlos vertragen. Galactose wird hauptsächlich in der Leber als Galactose-1-phosphat gespeichert. Sie kann aber auch nach Isomerisierung zu Glukose-1-phosphat und Metabolisierung zu CO₂ verstoffwechselt werden. Die Plasmahalbwertszeit des Levovist® beträgt 11 Minuten (Angabe der Schering AG). Der Palmitinsäurezusatz in Levovist® erhöht die Stabilität der Mikrobläschen so weit, daß sie die Lungenkapillarpassage, auch mehrmals, überstehen. Hierdurch wird die Wirksamkeit im gesamten Gefäßbett gewährleistet (32).

Problematisch in der Befundung der Durchblutungsuntersuchungen mit den Ultraschallmethoden ist deren geringe Objektivierbarkeit. Eine Möglichkeit der objektiven Quantifizierung wäre die Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie. Mit dieser Methode wird die Wirkung eines Ultraschallkontrastmittels während der Anflutung und des Auswaschens in den bzw. aus dem Herdbefund unter Nutzung der ausgehenden Videosignale des Ultraschallgerätes gemessen. Huber et al. (49,50) haben 1998 die Ergebnisse dieser Methode unter der computerassistierten Registrierung der Veränderung der Farbdopplersignale nach Levovist®-Applikation publiziert. Bei Mammakarzinomen (N=31) war die Zunahme der color pixel density (Prozentsatz der Farbpixel in einer festgelegten Region (region of interest, CPD) signifikant stärker ausgeprägt und die Zeit bis zum Maximum der Änderung der CPD war signifikant kürzer als bei benignen Herdbefunden der Brust (N=16). Für die Anwendung der Videodensitometrie müßte der CPA besser als der Farbdoppler sein, da nur die Höhe der Signalamplitude farbkodiert ist, nicht die Richtung des Blutflusses. Der im Ultraschall dargestellte Blutfluß wird nach der Injektion von Ultraschallkontrastmittel (USKM) im CPA durch die Veränderung der Signalamplitude nur heller und ändert seine Farbe nicht. Damit ist nur eine Registrierung der Helligkeit über die Zeit und keine zusätzliche Analyse der Farbveränderung notwendig.

Prognoseeinschätzung von Mammakarzinomen

Die Ausprägung von Prognosefaktoren bestimmt die systemische (adjuvante) und lokale Therapie des Mammakarzinoms (51). Ihre frühzeitige Kenntnis erlaubt die schnellstmögliche Einleitung der wirksamsten bzw. maximal sinnvollen Therapie und vermeidet damit eine Unter- oder Übertherapie der konkreten Patientin.

Bisher findet die Bestimmung der etablierten Prognosefaktoren mit Ausnahme des Alters der Patientin nach der Operation des Mammakarzinoms statt und orientiert sich an den Faktoren Karzinomgröße, Lymphknotenmetastasierung, histologischer Differenzierungsgrad und Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (pTNM, G, ER, PR (51)). Aussagen zur Lymphknotenmetastasierung sind erst durch die axilläre Lymphonodektomie möglich. Um in Zukunft diese Operation vermeiden zu können, wurden und werden verschiedene andere Prognosefaktoren, wie c-erbB-2- Onkoprotein, EGF-Rezeptor (epithelial growth factor), Expression des mutierten p53, KI67-Expression (Proliferationsfaktor der Zellzyklusphasen G1, S und G2/M), S-Phase, uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp), PAI-1 (Inhibitor von uPA) und andere Faktoren in randomisierten Studien untersucht (52). Das Grading gilt heute schon als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben bei lymphknotennegativen Mammakarzinomen, die immerhin in ca. 30% innerhalb von 10 Jahren metastasieren (53). Da die „neueren“ Prognosefaktoren häufig mit den etablierten in einer abhängigen Wechselbeziehung stehen (KI67-Expression mit dem Grading), ist für deren Bewertung als unabhängige Prognosefaktoren die Multivarianzanalyse notwendig. Danach behielten nur PAI-1 und die S-Phase eine statistisch signifikant unabhängige prognostische Aussagekraft (54). Das sind Faktoren, die das Invasionspotential (PAI-1) und das Proliferationspotential (S-Phase) des Tumors beschreiben.

Bisher können diese neuen Prognosefaktoren nicht als prädiktive Faktoren für die Auswahl bestimmter Therapieformen (Hormon- oder Chemotherapie, Anthrazykline, Taxane, Herceptin®) eingesetzt werden.

Inzwischen gilt es als etabliert, daß Patientinnen mit einem kleinen Mammakarzinom und einer hohen angiogenetischen Aktivität und hoher Gefäßdichte eine schlechtere Prognose als die gering durchbluteten haben (55,56). Nach den histomorphologischen Untersuchungen von Weidner et al. (57) ist die „microvessel density“ der einzige statistisch signifikante Vorhersagewert für die Überlebenschancen bei Patientinnen ohne Befall der operativ entfernten Lymphknoten. Diese

Aussage konnte durch weitere immunhistochemische Arbeiten am Mammakarzinom bestätigt werden (58,59).

Seit 1996 sind einige Publikationen zur präoperativen Einschätzung der Prognose von Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit Hilfe der Farbdopplersonographie erschienen (60-62). Nach Lee et al. (60) und Peters-Engl et al. (63) soll bei T1-Mammakarzinomen eine hohe systolische Maximalgeschwindigkeit in den Tumorgefäßen mit der Lymphknotenmetastasierung assoziiert sein, nicht jedoch bei den größeren Mammakarzinomen.

Therapiemonitoring von Mammakarzinomen

Nach dreidimensionaler mikroskopischer Betrachtung (Schichtdicke 50 Mikrometer) und CD34-Gefäßwandfärbung der Tumor-Kapillaren-Einheit (oder two-cell compartment-model of a tumor) konnten auf ein Gramm Tumorgewicht 10^9 Tumorzellen und 2×10^7 Endothelzellen berechnet werden. Es werden also 100 Tumorzellen von einer Endothelzelle versorgt. Auch wenn diese Berechnung aufgrund der Heterogenität der Tumovaskularisation fehlerhaft sein kann, ist die Vorstellung faszinierend, mit der Zerstörung einer Endothelzelle 100 Tumorzellen zu vernichten (64). Eine Resistenz der Endothelzellen ist aufgrund ihrer langsamen Zellteilung ebenfalls nicht zu erwarten. Das erklärt die Beobachtung, daß das antiangiogenetisch wirkende Paclitaxel noch nach 20 Therapiezyklen (im dreiwöchigen Abstand) bei einigen Patientinnen eine Tumorkontrolle ermöglicht (65,66).

Die theoretischen Möglichkeiten dieses two-cell-compartment-models sind mit der Chance der antiangiogenetischen Erhaltungstherapie im kombinierten Einsatz mit Zytostatika noch nicht ausgeschöpft. Durch die antiangiogenetisch wirkenden Medikamente wird z.B. der hydrostatische Druck im Tumor gesenkt, und die intravasalen Chemotherapeutika können in das Interstitium des Tumors gelangen (Folkman 1997).

Die meisten Anti-Angiogenese-Medikamente (IL-4, IL-12, TNP-470 (67)) wirken allerdings nur tumorstatisch und müssen als Dauertherapie eingesetzt werden, eine Messung des Tumordurchmessers oder -volumens unter der Therapie erlaubt somit nur eingeschränkte Aussagen zur therapeutischen Effektivität (67). Beim heterogen durchbluteten Mammakarzinom macht eine Messung des Sauerstoffpartialdruckes ebenso wie die Messung der Vaskularisierung unter der Therapie wahrscheinlich wenig Sinn. Diese Verfahren sind außerdem invasiv. Es bleiben also zwei Methoden, die Messung von Angiogenese-Faktoren im Serum oder Urin als Surrogatmarker für die antiangiogenetische Therapie und die Messung der Durchblutung mittels bildgebender Verfahren (67). Mit dem zunehmenden Einsatz der primären oder präoperativen oder neoadjuvanten Chemo- oder Hormontherapie müssen diese Verfahren auch zur Messung der Effektes dieser Therapien auf die Tumordurchblutung eingesetzt werden. Bisher waren das inflammatorische und das lokal fortgeschrittene Mammakarzinom die klassischen Indikationen für eine primäre Chemotherapie. Durch diese Chemotherapie wird eine Operation mit einer Resektion im Gesunden erst möglich (68). Mit dieser Therapieform können klinische Remissionsraten zwischen 50 und 80% erreicht werden. (68-70). Das 5-Jahres-Gesamtüberleben liegt dann bei ca. 50% (71). In diesen Studien konnte der Zusammenhang zwischen dem Ansprechen des Tumors und dem rezidivfreien und dem Gesamtüberleben der Patientin gezeigt werden (68). Bei den operablen Mammakarzinomen brachte die präoperative Chemotherapie im Vergleich mit der adjuvanten Chemotherapie in einer randomisierten Studie der amerikanischen Studiengruppe NSABP (Studie B-18, 1506 Patientinnen (72)) keinen signifikanten Gewinn für das Gesamtüberleben der Patientinnen. Es konnte aber in der Gruppe der präoperativ chemotherapierten Patientinnen mit einem Mammakarzinom von mindestens 5 cm Größe die Rate der brusterhaltenden Operationen von 8% auf 22% erhöht werden.

Die Beurteilung des Ansprechens des Tumors auf die Chemotherapie ist deshalb wichtig für die Prognose der Patientin und die weitere Therapieplanung. Von der Beurteilung der Remission hängt es ab, ob diese Chemotherapie fortgesetzt werden kann oder abgebrochen werden muß, ob andere Therapieformen eingesetzt werden (Bestrahlung, veränderte Chemotherapiesubstanzen) und ob eine brusterhaltende Operation mit der Patientin besprochen und geplant werden kann. Eine frühzeitige Beurteilung vermeidet unnötige Nebenwirkungen und gestattet eine kalkulierte Chemotherapie.

Verschiedene Methoden wurden bisher zum Therapiemonitoring unter primärer Chemo- oder Hormontherapie eingesetzt, wie die konventionelle Sonographie (73), dreidimensionale Sonographie (47), die Mammographie (74), die MRT-Kontrastmittel-Untersuchung (28,75), die MRT-Spektroskopie (76,77), die PET (29). Deren Ergebnisse werden zusammen mit denen der dopplersonographischen Verfahren in der Diskussion dieser Habilitationsschrift (Abschnitt 5) verglichen werden.

2 Zielstellung der Arbeit

In der vorgelegten Habilitationsschrift soll systematisch der Wert der einzelnen sonographischen Methoden der Darstellung der Tumordurchblutung einschließlich der experimentellen Kontrastmittel-Videodensitometrie in der Diagnostik, der Einschätzung der Prognose und schließlich für das Therapiemonitoring bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser bildgebenden Verfahren werden mit denen der anderen bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomographie und außerdem mit der Gefäßmorphologie verglichen (Messung von verschiedenen Vaskularisationsparametern mittels automatisierter Mikroskop-Bildanalyse nach CD34-Gefäßfärbung). Dazu werden die Methoden in einer logischen Folge nacheinander untersucht, so daß eine wissenschaftliche Fragestellung, auf den Ergebnissen der vorhergehenden Studien aufbauend und aus diesen resultierend, nach der anderen bearbeitet und beantwortet wird.

Alle durchgeführten Untersuchungen haben eine wissenschaftliche Zielstellung. Die Ergebnisse der Durchblutungsuntersuchung dürfen das klinische Vorgehen nicht beeinflussen. Die Patientinnen werden vor der Untersuchung über den wissenschaftlichen Charakter der Untersuchung aufgeklärt und ihre Zustimmung eingeholt. Ein Ethikvotum (106/93) der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin, Charité, für die Durchblutungsuntersuchungen wurde eingeholt. Die Durchblutungsuntersuchungen und deren Dokumentation und Klassifikation erfolgen prospektiv und präoperativ. Die experimentelle Methode der Kontrastmittel-Videodensitometrie der Mamma mit dem Color Power Angiomode und deren automatische, PC-gestützte Auswertung der Veränderung der mittleren Helligkeit der Pixel über die Zeit wird als Teil dieser Habilitationsschrift inauguriert. Die Präsentation der Ergebnisse der Phase II-Studie dieser Methode wird erstmals, nach Kenntnis der internationalen Literatur, auf dem RSNA im November 1999 in Chicago und auf dem 21st San Antonio Breast Cancer Symposium im Dezember 1999 erfolgen. Die Vorstellung der Kontrastmittel-Videodensitometrie zur Untersuchung des Ansprechens von Mammakarzinomen auf eine präoperative Chemotherapie erfolgt, nach Kenntnis der internationalen Literatur, in dieser Arbeit erstmals.

Die PC-gestützte, automatisierte Mikroskop-Bildanalyse (AMBA) der Vaskularisation von Mammakarzinomen am CD34-gefärbten histologischen Schnitt ist ebenfalls experimentell. Es werden weitere Gefäßparameter neben den etablierten Parametern „microvessel density“ und „microvessel count“ bestimmt. Die Vaskularisationsparameter werden getrennt in groß- und kleinelumige Tumorgefäße ausgewertet. Die Publikation dieser Untersuchungen zum Vergleich von Tumordurchblutung und Vaskularisation ist vom „Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology“ zur Publikation akzeptiert. Die Präsentation zur Änderung der Vaskularisation unter präoperativer Chemotherapie erfolgt ebenfalls auf dem 21st San Antonio Breast Cancer Symposium. Die ausführliche Beschreibung der Messung von Veränderungen der Vaskularisation unter präoperativer Chemotherapie am CD34-gefärbten Schnitt mit der AMBA erfolgt erstmals in dieser Arbeit. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen zur Durchblutung und Vaskularisation von Mammatumoren werden Schlußfolgerungen für die klinische Praxis gezogen.

Die Darstellung erfolgt als Monographie, ergänzt durch publizierte Forschungsergebnisse entsprechend der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin vom 29. Januar 1999.

3 Patientinnen und Methoden

Die verschiedenen, hier dargestellten Ultraschallmethoden zur Untersuchung der Tumordurchblutung bauen zeitlich und methodisch aufeinander auf.

Bis 1995 wurden die Untersuchungen in der Abteilung für pränatale Diagnostik (Leiter: Prof. Dr. med. R. Bollmann) mit der hochfrequenten Farbdopplersonographie durchgeführt (6 MHz Ultraschallwellenfrequenz, UM 9, ATL, Bothel, USA). Ab 1996 wurde in den Studien der neu entwickelte, höherfrequente Color Power Angiomode (10 MHz Ultraschallwellenfrequenz, UM 9 und HDI 3000, ATL, Bothel, USA) eingesetzt. Seit 1996 ist das Ultraschallkontrastmittel Levovist® (Schering AG, Berlin, Deutschland) zugelassen und seit 1997 konnte ich die Videodensitometrie-Technik in der Forschungs-Abteilung Kontrastmittelentwicklung Ultraschall der Schering AG (Leiter: Dr. T. Fritsch) zur Untersuchung der quantitativen Kontrastmittelkinetik im CPA nutzen. Die Studien zur präoperativen Chemotherapie von Mammakarzinomen begannen an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Campus Charité Mitte (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. Lichtenegger) im März 1996.

Zur Erfassung der Reliabilität (Zuverlässigkeit des Testverfahrens) der Ultraschall-Durchblutungsmessung wurden deren Ergebnisse mit denen der MRT-Untersuchung (Paralleltest-Reliabilität, Abschnitt 3.1.3.) und mit denen der Tumovaskularisation (Abschnitt 3.3.) an identischen Patientinnen verglichen. Zur Testung der Validität (Tauglichkeit des Verfahrens für den zu messenden Sachverhalt) wurden alle Ergebnisse der Durchblutungsmessung mit den histologischen Ergebnissen und deren diagnostische Effektivität (Spezifität, Sensitivität) mit anderen Verfahren verglichen (Abschnitt 1.2.1.). Bei den Messungen zum Therapiemonitoring erfolgte der Vergleich mit dem klinischen, sonographischen und histologischen Ansprechen. Außerdem wurden, wenn möglich, die Untersuchungsergebnisse mit denen der kontralateralen, nicht erkrankten Brust verglichen (kriteriumsbezogene Validität).

Die Objektivität und Wiederholbarkeit der Messungen konnte bei der Gefäßmorphometrie durch wiederholte Messungen unterschiedlicher Untersucher und die Bestimmung des Variationskoeffizienten untersucht werden, bei den Durchblutungsuntersuchungen mußten aus Gründen der Rücksichtnahme auf die (präoperative) Patientin Mehrfachuntersuchungen eines Untersuchers reichen.

Im Sinne der Konstruktvalidität wurde jede Untersuchung mit einer Hypothese begonnen, die in der Diskussion angenommen oder verworfen wird.

3.1 Farbdopplersonographie (CD)

3.1.1 Differentialdiagnose und Farbdopplersonographie

Die Hypothese dieser Studie ist, daß verschiedene Parameter der gepulsten Farbdopplersonographie wie die maximale systolische Geschwindigkeit, der Resistance Index und die semiquantitative Parameter der Anordnung der Farbpixel geeignet sind, zwischen benignen und malignen Herdbefunden präoperativ zu unterscheiden.

Patientinnen: Zwischen Oktober 1993 und Mai 1995 wurden 200 Patientinnen (99 mit einem Mammakarzinom und 101 mit einem gutartigen Herdbefund der Mamma) präoperativ neben der Mammographie, der hochauflösenden Mammasonographie (Breit-Band-Scanner, 5-10 MHz), dem Mamma-MRT auch mit dem gepulsten und farbkodierten Farbdoppler untersucht.

132 der Patientinnen hatten einen Tastbefund selbst festgestellt oder ihr Gynäkologe stellte ihn bei der Vorsorgeuntersuchung fest, bei 68 wurde durch das verdeckte „Screening“ bei einer Routine-Mammographie ein nicht palpabler Herdbefund festgestellt.

Die Charakteristik der Patientinnen und der histologischen Befunde wird in Tabelle 1 (Abschnitt 1.2.1.) dieser Habilitationsschrift wiedergegeben. Bei 57% der präoperativ untersuchten Patientinnen war der Herdbefund in der linken Brust lokalisiert. Die Patientinnen mit benignen Herdbefunden der Brust waren signifikant jünger (medianes Alter: 47,6 Jahre) als die mit einem Mammakarzinom (medianes Alter: 58,1 Jahre).

Alle histologischen Untersuchungen erfolgten während des Untersuchungszeitraumes im Pathologischen Institut der Charité, Campus Charité Mitte (Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. Dietel). Die zytologischen Untersuchungen der Zystenpunktate erfolgten im zytologischen Labor (Leiter: Dr. J.-U. Blohmer) der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité, Campus Charité Mitte (Geschäftsführende Direktoren: Prof. Dr. med. U. Lau (bis 3/95) und Prof. Dr. med. W. Lichtenegger (ab 4/95)). Die Stadien des Mammakarzinoms waren wie folgt verteilt: pTis: N=4; pT1: N=50; pT2: N=31, pT3/pT4: N=14. Lymphknotenmetastasen (pN1) hatten 48 dieser Patientinnen. Fünf Patientinnen hatten Fernmetastasen (M1).

Methodik: Für diese Studie wurden die Ultraschallgeräte Ultramark 9 und HDI 3000 (ATL, Bothell, WA, USA) mit dem gleichen elektronischen Linearschallkopf mit der Breitbandtechnologie L5-10 und einer Doppler-Frequenz von 6 MHz eingesetzt.

Folgende Geräteeinstellung (pre-set) wurde bei allen Untersuchungen automatisch mit Nutzung des Schallkopfes L5-10 eingestellt: Maximale Farbpriorität, minimaler Farbfilter (um auch geringste Flußgeschwindigkeiten farbig darstellen zu können), hohe PRF (Pulswiederholungsfrequenz oder pulsed repetition frequency, 700-1000 Hz) zu Beginn der Untersuchung. Diese wurde schrittweise reduziert, um das Aliasing-Phänomen (Abbildung 2, Abschnitt 1.2.) bei schnellen Flüssen zu vermeiden, Farbgainverstärkung (color gain) ca. 50% (Beginn mit maximaler color gain und Reduktion soweit, daß gerade ein leichtes Farbrauschen sichtbar war.). Die individuelle Einstellung der color gain und der PRF wurde während der gesamten Untersuchung beibehalten. Intraindividuell durften keine Unterschiede in der Geräteeinstellung gemacht werden. Es durfte mit dem Schallkopf kein Druck auf das Gewebe ausgeübt werden.

Wenn mit dem Farbmodus ein Fluß sichtbar wurde, wurde das sample volume des Spektraldopplers in diesen Fluß gelegt und die Dopplerflußkurve drei Mal abgeleitet. Alle im Herdbefund sichtbaren Blutflüsse wurden mit dieser Methode gemessen. Die Kurve mit der höchsten maximalen systolischen Geschwindigkeit wurde für diese Studie ausgewählt, da so die genaueste Analyse der einzelnen Parameter reproduzierbar ist. Für die Ableitung korrekter Geschwindigkeiten, mußte der Untersucher einen Dopplerwinkel (alpha) von mindestens 30-60 Grad einhalten. Wenn es nicht möglich war, einen Dopplerwinkel von kleiner als 30 Grad einzustellen, mußte mit Hilfe der arithmetischen Winkelkorrektur ein Winkel zwischen 0 und 30 Grad in diesem Bereich angenommen und der entsprechende Geschwindigkeitswert berechnet und gewählt werden (Ultraschall-Geräte-Software). Die Blutflüsse im korrespondierenden Quadranten der gegenüberliegenden, nicht erkrankten Brust (Spiegelbild-Quadrant) wurden mit den gleichen Methoden untersucht und auch hier wieder die Dopplerflußkurve aus dem Gefäß mit der höchsten maximalen systolischen Geschwindigkeit für die Analyse gewählt.

Folgende Farbpixelcharakteristika und Parameter der Dopplerhüllkurven wurden hinsichtlich ihres Wertes für die Differentialdiagnostik von Herdbefunden der weiblichen Brust untersucht:

- Maximale Anzahl der pulsierenden Pixelflächen (Blutflüsse) in einer Ebene des Herdbefundes
- Lokalisation des mit dem Farbdoppler sichtbaren Blutflusses (pulsierende Farbpixel) im Herdbefund oder in seiner Peripherie (definiert als Randbereich um den Herdbefund, der ca. 10% des maximalen Durchmessers des Herdbefundes entspricht). Der Herdbefund wurde als Region mit einer zur Umgebung verschiedenen Echogenität definiert (im allgemeinen echoarmer Herdbefund in einem echoreichen Drüsengewebe).
- Semiquantitative Klassifikation der pulsierenden Farbpixel in 3 Gruppen nach Sohn et al. 1996 (61,79, Abbildungen 3-5):

Klasse I: Nur einzelne, isolierte, pulsierende Farbpixel sind sichtbar (eventuell Artefakte durch Patientenbewegung oder Geräterauschen).

Klasse II: Eine pulsierende Pixelfläche ist sichtbar.

Klasse III: Mehr als eine Pixelfläche ist sichtbar.

-maximale systolische Geschwindigkeit (V_{max}) und Resistance-Index (RI) (Abbildung 2, Abschnitt 1.2.).

-Differenz zwischen Blutfluß im Herdbefund und im Spiegelbild-Quadranten hinsichtlich von V_{max} und RI

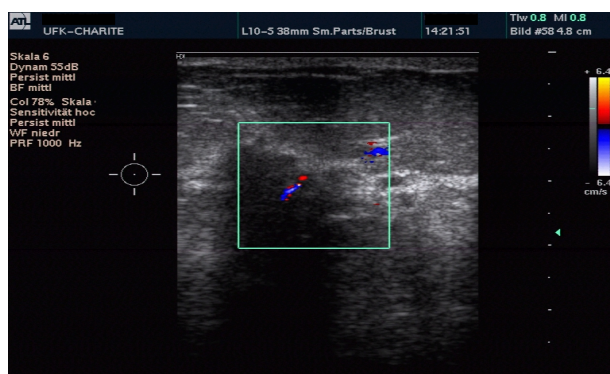


Abbildung 3: Farbpixelverteilung der Pixelklasse I im Tumor (Mammakarzinom pT3pN1G2M0).

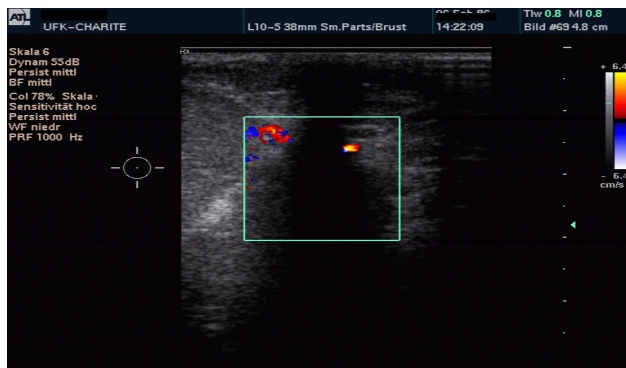


Abbildung 4: Farbpixelverteilung der Klasse II im Rand des Tumors (Mammakarzinom pT3pN1G2M0)

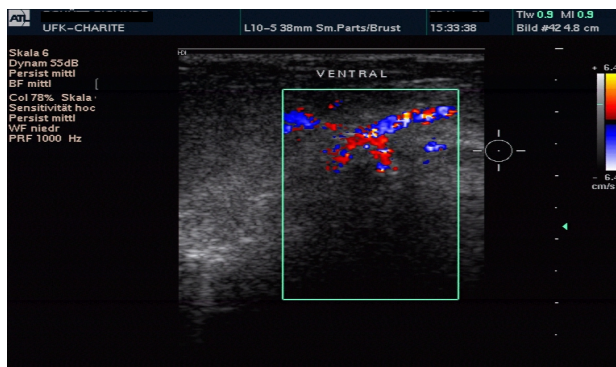


Abbildung 5: Farbpixelverteilung der Klasse III im Tumor (Mammakarzinom pT4dpN1G2M0)

Die Charakteristik der farbigen, pulsierenden Pixel (Anordnung, Zahl, Klassen) wurde in nur einer Ebene des Herdbefundes bestimmt, um Mehrfachmessungen zu vermeiden. Es wurde die Ebene mit den meisten pulsierenden Pixelpunkten oder -flächen gewählt.

Zugelassen waren nur die Untersuchungen, bei denen eine eindeutige Zuordnung in die Gruppe der benignen oder die Gruppe der malignen Herdbefunde möglich war und eine Untersuchung des Spiegelbildquadranten möglich war. Bei 43 Patientin war es nicht möglich, einen Blutfluß in der kontralateralen Brust darzustellen. Bei 4 Patientinnen war diese Brust bereits abladiert. Wenn im Herdbefund kein Blutfluß darstellbar war (N=24), wurden diese den benignen Herdbefunden zugeordnet. Bei den anderen oben genannten Parametern mußte der Untersucher entscheiden, ob er den Herdbefund der Gruppe der benignen oder der Gruppe der malignen Herdbefunde zuordnet. Für fehlende Meßergebnisse wurden, um die anderen Daten der Patientin trotzdem in die Studie aufnehmen zu können, sogenannte Missing-Werte eingesetzt. Daher ist die Zahl der in die verschiedenen Tests eingegangenen Messungen variabel und häufig kleiner als die aus 99 Patientinnen bestehende Patientinnengruppe. Fehlende Meßwerte konnten auftreten, wenn es z.B. gelang eine pulsierende Pixelfläche darzustellen und damit die Einteilung in die 3 Pixelklassen gelang, aber eine Dopplerflußkurve konnte nicht mit gepulsten Spektraldoppler abgeleitet werden. Die Untersuchung wurde prospektiv und präoperativ durchgeführt und dokumentiert und mit den am Folgetag vorliegenden histologischen Befunden verglichen.

Statistische Untersuchungen: Der Wilcoxon Matched Pairs Signed Ranks-Test, der Student's t-Test und der Chi-Quadrat-Tast wurden für die statistische Untersuchung der Unterschiede zwischen benignen und malignen Herdbefunden hinsichtlich der Parameter der Farbdoppleruntersuchung benutzt, eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von < 0.05 wurde als signifikant angenommen. Alle statistischen Auswertungen dieser Analyse erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 6.0.1.

3.1.2 Prognose und Farbdopplersonographie

Die Hypothese dieser Studie ist, daß mit den Parametern der CD in vivo auf die histomorphologischen Ergebnisse der etablierten Prognosefaktoren (pT, pN0, G, Hormonrezeptorstatus) geschlossen werden kann.

Patientinnen und Methodik: Es wurden die gleichen dopplersonographischen Messungen mit der gleichen Technologie bei den 99 Patientinnen mit einem Mammakarzinom durchgeführt wie bei der Untersuchung zur CD in der Differentialdiagnose (Abschnitt 3.1.1.).

Die farbdopplersonographische Befundung und Dokumentation erfolgte prospektiv und präoperativ im gleichen Zeitraum vom Oktober 1993 bis zum Mai 1995 wie die zur Differentialdiagnose.

Die untersuchten, etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms waren die Tumorgroße (pTis-pT1, pT2, pT3/pT4), der Lymphknotenstatus (pN0, pN1) und das Grading (G 1-3) und der Hormonrezeptorstatus.

Statistische Untersuchungen: Alle statistischen Auswertungen dieser Analyse erfolgten ebenfalls mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 6.0.1.

Für die Analyse, ob es bei der Ausprägung der Parameter der CD Unterschiede zwischen allen Tumorstadien gab, wurde der nichtparametrische Tests für unabhängige Stichproben (Kruskal-Wallis 1-Way Anova) angewendet. Der statistische Vergleich zwischen je zwei einzelnen pT-, pN- oder Grading-Gruppen erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney-Test, jeweils mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3.1.3 Vergleich der Farbdopplersonographie mit der Magnetresonanztomographie (MRT) in der Differentialdiagnose von Mammatumoren

Die Hypothese dieser Arbeit ist es, daß die Ergebnisse der Farbdopplersonographie und der Kontrastmittel-MRT der Mamma miteinander in Wechselbeziehung stehen (korrelieren), da mit beiden Methoden Merkmale der Durchblutung der Herdbefunde der Mamma dargestellt werden. Die Ergebnisse der Farbdopplersonographie wären dann mit denen der MRT der Mamma vergleichbar.

Patientinnen: Von den präoperativ mit beiden Methoden im Jahr 1996 untersuchten 37 Patientinnen wurde bei 27 Patientinnen ein Karzinom (pT1: N=11, pT2: N=6, pT3/pT4: N=4, Rezidiv: N=6) festgestellt und bei 10 Patientinnen ein benigner Herdbefund (Fibroadenom: N=2, eine Form der Mastopathie: N=6, Papillom: N=1, Abszeß: N=1). Bei den 27 Patientinnen mit einem Mammakarzinom wurden, aufgrund von Multifokalität und Multizentrität bei 5 Patientinnen, insgesamt 36 Karzinome entdeckt und untersucht.

Diese 36 Karzinome hatten die folgenden histologischen Typen: invasives duktales Karzinom: N=24, invasives duktales Karzinom und intraduktales Komponente: N=6, invasives lobuläres Karzinom: N=4, medulläres Karzinom: N=2. Das mediane Alter der Patientinnen betrug 54 Jahre (39-72 Jahre).

Methodik: Die Ultraschalltechnologie, Geräteeinstellung, Ultraschalluntersuchung, Definition der sonographischen Herdbefunde, Parameter der Farbdopplersonographie waren identisch mit denen der Studien in den Abschnitte 3.1.1. bis 3.1.2.

Die kernspintomographischen Untersuchungen erfolgten mit einem Hochfeld MRT, 1,5 Tesla (ACN-NT 15, Philips, Eindhoven, Holland, und Magnetom SP 63, Siemens, Erlangen, Deutschland) im MRT-Labor der Strahlenklinik und Poliklinik der Charité (Geschäftsführender Direktor Professor Dr. Dr. h.c. R. Felix) im Campus Virchow-Wedding, in erster Linie durch die Herren Dres. H. Oellinger und C. Siewert. Die Datenerfassung erfolgte durch Herrn G. von Klitzing.

Zu Untersuchungsbeginn wurden mit einem transversalen und coronaren Localizer die Untersuchungsebenen festgelegt; anschließend wurde mit einer T2-gewichteten Spin-Echo-Sequenz (TR=2500 ms, TE=90 ms) untersucht. Darauf folgte eine T1-gewichtete 3D-Gradienten-Echo-Sequenz (TR 11ms, TE 4,9ms, Matrix 256x256). Bei allen 37 Patientinnen wurde in transversaler und bei 26 Patientinnen in coronarer Schnittführung mit der 3D-Technik untersucht. Die Schichtdicke betrug 2,5 beziehungsweise 4 mm. Als Kontrastmittel wurde Gadolinium DTPA (Gd-DTPA, Magnevist®, Dosierung: 0,2 mg/kg Körpergewicht) in die linke Kubitalvene über einen MR-Injektor (XD 7000, Fa. Ulrich, Ulm) injiziert. Für diese Untersuchungen wurde ein Volumendurchsatz des Kontrastmittels (KM) von 3 ml/s eingestellt. Nach der Kontrastmittelgabe wurde die 3D-GE-Sequenz fünffach wiederholt. Nach Untersuchungsende wurden Subtraktionsbilder der Kontrastmittelkinetik berechnet (Postkontrast minus Prekontrast) und unter Verwendung des MIP-Algorithmus (Maximale Intensitäts Projektion) in cranio-caudaler (CC) und mediolateraler Ansicht (ML) eine dreidimensionale Darstellung beider Mammæ angefertigt. Diese Darstellung vermittelt einen Gesamteindruck über die verschiedenen Kontrastmittelanreicherungen (Parenchym, Tumor, Gefäße) und erfolgte in Anlehnung an den in der konventionellen Mammographie verwendeten Strahlengang. Die Subtraktionsaufnahmen wurden auf mögliche Läsionen untersucht, dann in den Postkontrastaufnahmen mittels ROI-Technik (region of interest) das Signalenhancement gemessen und die Kinetik der Anreicherung über die Zeit als Kurve berechnet und dargestellt. Die

Kontrastmittelanreicherung im Tumor wurde bewertet und wie folgt klassifiziert: Anreicherung am Rand (ring like enhancing), Rand und Zentrum, homogene oder inhomogene Anreicherung. Zur Charakterisierung des Kurvenverlaufes wurden zu bestimmten Zeitpunkten (alle 75 Sekunden) die absoluten Signalintensitäten bestimmt und aus deren Verhältnis zur Signalintensität ohne Kontrastmittel der relative Signalanstieg in Prozent errechnet.

Statistische Untersuchungen: Die Befunderstellung der Farbdopplersonographie und der MRT erfolgten prospektiv und präoperativ. Zunächst wurde untersucht, ob jede Methode für sich in der Lage ist, benigne von malignen Herdbefunden zu trennen. Diese Berechnung erfolgte anhand des relativen Signalanstiegs nach Kontrastmittelgabe beim MRT und der maximalen systolischen Geschwindigkeit beim CD mit der Varianzanalyse für 2 Gruppen (benigne und maligne), t-Test für unabhängige Stichproben. Danach wurde für die Erkennung eines Zusammenhanges zwischen beiden Methoden (MRT und CD) eine Produktmomentkorrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt. Die zugelassene Irrtumswahrscheinlichkeit (α -Fehler) betrug bei allen Berechnungen 5%.

3.1.4 Therapiemonitoring und Farbdopplersonographie

Neben der Bewertung dieses neuen Untersuchungsverfahrens in der Diagnostik und Prognoseeinschätzung interessierte uns sein Einsatz im Therapiemonitoring.

Während einer laufenden Phase-II-Studie (3/96 bis 3/97) zur präoperativen Chemotherapie lokal fortgeschrittener (T3-) und inflammatorischer (T4d-) Mammakarzinome (69,70) wurden bei diesen Patientinnen Untersuchungen mit der CD und unter Dokumentation der in den Abschnitten 3.1.1. und 3.1.2. aufgeführten Doppler-Parameter durchgeführt. Auch hier erfolgte die Datenerfassung dieser Parameter prospektiv und wurde mit dem klinischen Ansprechen verglichen. Für eine sonographische Diametrie waren die Herdbefunde zu groß (lokal fortgeschrittene Karzinome größer als 5 cm, Schallkopfbreite 3,8 cm, Linearschallkopf) oder hatten keine meßbaren Befunde in der Brust (inflammatorische Karzinome).

Die Hypothese ist, daß anhand der Veränderung von farbdopplersonographischen Parametern auf das Ansprechen des Mammakarzinoms auf eine präoperative Chemotherapie geschlossen werden kann.

Patientinnen: Neun Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom (LABC) und 12 mit einem inflammatorischen Mammakarzinom (IBC) und ohne Fernmetastasierung (Röntgenuntersuchung des Thorax, Oberbauchsonographie und Skelettszintigraphie vor Einschluß der Patientinnen in die Studie) erhielten präoperativ 3 Zyklen einer Chemotherapie mit Ifosfamid 5 g/m² und Epirubicin 60 mg/m² alle 14 Tage (mit Filgastrim®) und adjuvant Epirubicin 60 mg/m² und Paclitaxel 175 mg/m² alle 14 Tage (mit Filgastrim®), gefolgt von Tamoxifen.

Östrogenrezeptor-positiv waren 15 Patientinnen, Progesteronrezeptor-positiv davon 5 Patientinnen. Die Hormonrezeptorbestimmung erfolgte immunhistochemisch mit der streptavidin-biotin- Markierung (LSAB-Methode) am Paraffinschnitt, der entsprechend vorbereitet (u.a. deparaffiniert) wurde. Die Antikörper zur Darstellung der Östrogenrezeptoren waren 6F11 (Novocastra), zur Darstellung der Progesteronrezeptoren PR-2C5 (Zymed). Diese Rezeptorenfärbung ist eine Kernfärbung. Es wurde der Prozentsatz der gefärbten Zellen (Kerne) angegeben und ein Karzinom entsprechend des International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer V: Update 1998 (51) als rezeptorpositiv bezeichnet, wenn mindestens 10% der Zellen angefärbt waren. Die Einteilung des Gratings erfolgte nach der Methode von Bloom und Richardson (81) in die Grade 1 (gut differenziert) bis 3 (gering differenziert). Die Beurteilung des histologischen Tumortyps, der Tumorgroße und der Lymphknotenmetastasierung erfolgte am mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Paraffinschnitt. Die Einschätzung der histologischen Regression erfolgte in die 4 Grade nach Sinn et al. (82).

Das mediane Alter der Patientinnen betrug 53 Jahre (Range 40-60 Jahre). Alle Patientinnen befanden sich vor Beginn der Therapie in einem guten Allgemeinzustand (Grad 0-1 nach WHO).

Ansprechrate insgesamt (ORR): 65% (Komplette Remission, CR: keine Patientin; partielle Remission, PR: 13 Patientinnen; keine Veränderung, NC: 8 Patientinnen; Tumorprogress, PD: keine Patientin).

16 dieser Patientinnen wurden während der Chemotherapie mit der CD untersucht. Neun dieser Patientinnen hatten ein T3- und sieben Patientinnen ein T4d- Mammakarzinom.

Methodik: Die Ultraschall- und Doppleruntersuchung erfolgte mit der gleichen Technologie, Geräteeinstellung und Untersuchungsmethodik wie in den Abschnitten 3.1.1. und 3.1.2. Folgende Parameter wurden prospektiv erhoben und dokumentiert:

- maximale systolische Geschwindigkeit (V_{max}) vor Beginn und nach der präoperativen Chemotherapie
- Resistance Index (RI) vor Beginn und nach der präoperativen Chemotherapie
- Anzahl der pulsierenden Pixel vor und nach der präoperativen Chemotherapie.

Die Untersuchungsebene wurde im Untersuchungsprotokoll, im Ultraschallbild und auf der Haut der Patientin dokumentiert, um die nachfolgenden Ultraschalluntersuchungen in dieser Ebene und an den gleichen Blutgefäßen durchzuführen. Die Patientinnen wurden unter der Therapie im Abstand von 14

Tagen mit der CD untersucht. Der Ultraschalluntersucher war „geblindet“ in bezug auf die klinische Remission, das heißt, er wußte nicht, ob die Patientin auf die Therapie angesprochen hat oder nicht. Die Ergebnisse der ersten und der letzten Doppler-Ultraschalluntersuchung wurden miteinander verglichen.

3.2 Ultraschall-Kontrastmittelsonographie (Videodensitometrie)

3.2.1 Color Power Angiomode (CPA) im Vergleich zur Farbdopplersonographie (CD)

Aus der Darstellung der Methodik der Farbdopplersonographie-Studie wird klar, daß es schwierig ist, die Ergebnisse dieser Ultraschalltechnologie zu reproduzieren und zu objektivieren. Es fehlen vom Untersucher weitgehend unabhängige und damit objektive Verfahren zur Quantifizierung der meßbaren Tumordurchblutung. Einen Ausweg aus diesem Dilemma bietet eventuell die Videodensitometrie, bei der die Kinetik des intravenös injizierten Kontrastmittels im Tumorgefäß (An- und Abflutung) gemessen wird. Theoretisch müßte hier der Color Power Angiomode (CPA) besser geeignet sein als die CD. Voraussetzung ist, daß der CPA nicht nur theoretisch aufgrund seiner höheren Ultraschallwellenfrequenz (10 MHz beim CPA vs. 6 MHz beim Farbdoppler), sondern auch praktisch in der Darstellung von Blutfluß in Mammatumoren sensibler als die CD ist.

Die Hypothese am Eingang dieses Abschnitts ist, ob der CPA eine im Vergleich zur CD höhere Sensitivität in der Darstellung von Blutflüssen im sonographischen Herdbefund hat.

Patientinnen: 50 Patientinnen wurden präoperativ vom Juni 1996 bis zum Dezember 1996 mit dem CPA untersucht. Bei allen Patientinnen stand die OP-Indikation wegen eines Tastbefundes (N=41) oder eines mammographisch suspekten Befundes (N=9) fest und wurde durch die Ultraschalluntersuchung nicht geändert.

36 Patientinnen hatten ein Mammakarzinom (pT1: N = 15, pT2: N = 14, pT3: N = 4, pT4: N = 3 ; pN0: N = 20, pN1: N = 14, pN2: N = 2), davon hatten 26 Frauen ein invasives duktales Karzinom, 7 Patientinnen ein invasives duktales Karzinom mit intraduktaler Komponente, eine Patientin ein invasives adenoid-zystisches und zwei Patientinnen ein invasives lobuläres Karzinom. 14 Patientinnen hatten benigne Mammaläsionen, davon 5 Patientinnen eine Fibrose, 4 Patientinnen ein Fibroadenom, zwei Patientinnen eine Entzündung, zwei Patientinnen eine Zyste und eine Patientin hatte ein Lipom. Das mediane Alter betrug bei den Patientinnen mit einem Mammakarzinom 55 Jahre (Range: 39 bis 74 Jahre) und bei den Patientinnen mit benignen Läsionen 48,5 Jahre (31 bis 70 Jahre).

Methodik: Die eingesetzte Ultraschalltechnologie, Geräteeinstellung und die Methodik der Definition der Herdbefunde mit dem hochauflösenden Ultraschall und der konventionellen Farbdopplersonographie war die gleich wie in den Abschnitten 3.1.1. und 3.1.2. Die verwendete CPA-Frequenz war 10 MHz.

Es wurde die Anzahl der pulsierenden Farbflächen erst im Farbdoppler (CD)- und dann im CPA-Mode bei jeder Patientin gezählt. Dazu wurde die Ebene des sonographischen Herdbefundes gewählt, in der die meisten Pixelflächen mit dem Farbdoppler ausgezählt werden konnten. In der gleichen Einstellung erfolgte die Auszählung der Pixelflächen mit dem CPA-Mode. Anschließend wurde verglichen, mit welcher Methode mehr Farbpixelflächen darstellbar waren.

Dazu erfolgte die Einteilung der Untersuchungsergebnisse in 4 Gruppen:

Gruppe 1: weniger Blutfluß im CPA als in der CD

Gruppe 2: gleiche Anzahl pulsierender Pixelflächen im CPA und in der CD

Gruppe 3: mehr Blutfluß im CPA als in der CD (1-3 pulsierende Pixelflächen zusätzlich)

Gruppe 4: deutlich mehr Blutfluß im CPA als in der CD (mehr als 3 pulsierende Pixelflächen zusätzlich).

Statistische Untersuchungen: Der Student's t-Test wurde für die statistische Untersuchung der Unterschiede zwischen CD und CPA benutzt, eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von < 0.05 wurde als signifikant angenommen. Die statistischen Auswertungen dieser Analyse erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 6.0.1.

3.2.2 Differentialdiagnose mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie

Es sollten in dieser experimentellen Studie mit der für diese Fragestellung erstmals eingesetzten Videodensitometrie mit der quantitativen Analyse der Kontrastmittelkinetik in Tumorgefäßen Parameter definiert werden, deren Ausprägung sich signifikant zwischen der Gruppe der benignen Läsionen der Mamma und der Gruppe der Mammakarzinome unterscheidet.

Für einen cut-off Wert, der eine hohe Spezifität erlaubt, sollte die Spezifität und Sensitivität berechnet werden. Diese Faktoren sollen dann im Therapiemonitoring (Abschnitt 3.2.3.) eingesetzt werden.

Die Hypothese dieser Phase II-Studie ist, daß es gelingt, mit verschiedenen Parametern der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie (folgend vielfach nur Densitometrie genannt) sicher

zwischen benignen und malignen Herdbefunden der Mamma zu unterscheiden. Die Ergebnisse der präoperativen Densitometrie wurden mit den histologischen Befunden verglichen. Ein Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren im Sinne einer Phase III-Studie erfolgte nicht.

Patientinnen: 33 Patientinnen (22 mit einem Mammakarzinom, 11 mit benignen Befunden der Mamma) wurden an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Campus Charité Mitte vom Juni 1997 bis zum Dezember 1997 präoperativ mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie untersucht. Die Stadien und histologischen Typen dieser Herdbefunde sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 4: Charakteristik der Mammakarzinome und Patientinnen mit einem Mammakarzinom (N=22)

Tumorcharakteristik	Anzahl
pT1	7
pT2	2
pT3	3
pT4b	4
pT4d	6
pN0	8
pN1	14
Invasives duktales Karzinom	20
Invasives lobuläres Karzinom	2
Mittleres Alter (Jahre)	58,3 ($\pm 11,5$)
Mittlere Tumorgroße (mm)	22,5 ($\pm 13,4$)
Arterieller Hypertonus, Gefäßerkrankung	keine

Tabelle 5: Charakteristik der benignen Befunde und der Patientinnen mit diesen Herdbefunden (N=11)

Tumorcharakteristik	Anzahl
Fibroadenom	3
Intrazystisches oder intraduktales Papillom	3
Mastitis nonpuerperalis	2
Fibröse Narbe	1
Mammahypertrophie ohne Herdbefund	2
Mittleres Alter (Jahre)	48 ($\pm 12,4$)
Mittlere Tumorgroße (mm)	19,8 ($\pm 12,3$)
Arterieller Hypertonus, Gefäßerkrankung	keine

Mit Ausnahme der histologischen Typen und des Alters der Patientinnen gab es auch in bezug auf die Größe des Herdbefundes keine signifikanten Unterschiede. Keine Patientin hatte einen arteriellen Hypertonus oder eine arterielle Gefäßerkrankung.

Für diese Phase II Studie wurden nur Patientinnen ausgewählt, bei denen sich ein Blutgefäß mit dem CPA darstellen ließ. Bei 6 von 39 für die Studie vorgesehenen Patientinnen gelang dies nicht (2 von 24 mit einem später histologisch nachgewiesenen Mammakarzinom, 4 mit histologisch gesicherten benignen Befunden). Bei 25 dieser 33 Patientinnen wurde der Herdbefund in der Brust von der Patientin selbst oder durch den behandelnden Arzt getastet. Bei 6 Patientinnen wurde der nicht palpable Herdbefund ausschließlich mammographisch und/oder sonographisch (je 3 bei malignen und benignen Befunden) festgestellt. Die beiden Patientinnen in der Vergleichsgruppe der benignen Befunde mit einer Mammahypertrophie hatten nach der histologischen Aufarbeitung des resizierten

Mammagewebes keinen Herdbefund, der vorher sonographisch darstellbar war. Hier wurde ein Parenchymgefäß innerhalb des Mammagewebes für die Densitometrie ausgewählt.

Die sonographisch ausgewählten Befunde wurden auf der Haut markiert, um sicher zu sein, daß das videodensitometrisch untersuchte Gewebe später operativ entfernt wurde.

Methodik: Auch diese Studie wurde mit der gleichen Gerätetechnologie, der gleichen Geräteeinstellung, Definition eines sonographischen Herdbefundes wie in den anderen Studien (Abschnitte 3.11. bis 3.2.1.) durchgeführt. Da die Videodensitometrie Helligkeiten in der gesamten region of interest (ROI) mißt, wurde die Helligkeit des B-Bildes nach Identifikation des Herdbefundes komplett zurückgenommen. Es konnte somit nicht zu einer Beeinflussung der Farbhelligkeit durch die B-Bild-Helligkeit kommen. Auch hier wurde die Geräteeinstellung während der gesamten Untersuchung einer Patientin nicht verändert (keine intraindividuellen Unterschiede, Abbildungen 6 bis 8).

Das Ultraschallkontrastmittel (USKM) Levovist® wurde dann intravenös als Bolus über 5-10 Sekunden in einer Konzentration von 300 mg/l (7 ml Lösung) durch einen weiteren Arzt injiziert. Zwei Minuten vorher wurde die Lösung durch Mischung und Schütteln des Galactose-Palmitin-Granulates mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Die gesamte Untersuchung, beginnend mit der Einstellung vor der USKM-Injektion wurde auf ein S-VHS-Videoband aufgenommen. Die Messung der Veränderung der Helligkeit über die Zeit nach Injektion des USKM erfolgte mit dem Videodensitometer vom S-VHS-Videoband.

Die Auswertungen der S-VHS-Videobänder erfolgten zunächst mit der Videodensitometrie im Tierlabor der Forschungsabteilung für Ultraschallkontrastmittel der Schering AG in Berlin (Leiter: Dr. T. Frittsch). Das Videodensitometer basierte auf einem personal computer (PC) mit folgender Konfiguration: 33 MHz Intel-486 Mikroprozessor, Dash 16 Videodigitizer-board, 8 Bit Graustufen (Keithley, USA).

Für die Videodensitometrie wurde folgendes Verfahren entwickelt:

Zunächst mußte das analoge S-VHS-Video in ein digitales Video konvertiert werden (digitalisiert werden), also in eine Datei, deren Daten mit einem Pentium-PC (199 MHz) verarbeitet werden können. Das analoge PAL-Video-Signal besteht aus Einzelbildern, die 25 mal in der Sekunde wiedergegeben werden. Ein Einzelbild besteht aus 768 x 576, also 442.368 Bildpunkten (Pixeln). Die Pixel sind rasterförmig angeordnet. Wenn für jeden Farbanteil, bestehend aus der Mischung der drei Grundfarben Rot, Grün und Blau (sogenannter RGB-Modus), ein Byte je Grundfarbe zur Kodierung verwendet wird (Die kleinste mögliche Speichereinheit des PC ist das Byte. Es setzt sich aus 8 möglichen Zustandsformen, den Bits, zusammen. Jedes Bit kann an oder aus (on oder off, 1 oder 0) sein. Das ergibt pro Byte $2^8=256$ mögliche Zustände.), ergeben sich $256 \times 256 \times 256 = 16,7$ Millionen verschiedene Farben. Das wären 1.327.104 Signale oder Bytes oder 1,26 Megabytes (MB) pro Einzelbild (Frame) und pro Sekunde (25 Einzelbilder) 33.177.600 Bytes oder 31,7 MB.

Kein derzeit verfügbarer PC kann diese Datenmenge pro Sekunde verarbeiten. Deshalb muß die Datenmenge komprimiert werden. In der hier vorgestellten Studie wurde eine theoretisch verlustfreie Methode zur Datenkomprimierung gewählt, bei der jedes Einzelbild in den Arbeitsspeicher gelegt, komprimiert, später auf die Festplatte gespeichert und numeriert wird. Im hier verwendeten 8 Bit Farbmodus werden aus 16,7 Millionen Farben 256 ausgewählt. Im Videospeicher steht also eine Zahl zwischen 0 und 255. Die echte Farbe liegt in einer Tabelle, der Palette. Die Zahl im Videospeicher zeigt nur die Position des echten Farbwertes in dieser Tabelle an. Bei der Wiedergabe des digitalisierten Videos wird diese Videodatei geöffnet, in den Arbeitsspeicher gelegt, dekomprimiert und Bild für Bild in der gespeicherten Reihenfolge in den Videospeicher kopiert. Dazu ist eine kommerziell erhältliche Zusatzhardware in Form einer sogenannten Digitalisierungskarte und eine passende Software notwendig.

Die nun vorhandenen digitalen Daten können nun analysiert werden, hier in Form der Densitometrie: Bei der additiven Farbmischung wird die Farbe um so heller, je höher der Anteil der einzelnen Farbkomponenten ist. Wenn alle Farbkomponenten den Maximalwert 255 angenommen haben, resultiert Weiß, wenn alle Farben den Minimalwert 0 haben, resultiert Schwarz. Für die Densitometrie müssen die informationstragenden Pixel der CPA-Signale ausgewertet werden und von den nicht informationstragenden B-Bild-Informationen getrennt werden. Die Auswertungssoftware muß also über einen Algorithmus verfügen, der die Bildinformation filtert. Dazu wurde in unserer Arbeitsgruppe eine spezielle Software auf der Grundlage der Game SDK (Software Development Kit) von Microsoft® entwickelt. Die Entwicklung und Programmierung dieses Algorithmus zur Videodensitometrie erfolgten unter der Mitarbeit der Herren P. Hieke und J. Schmidt (Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät) und Herrn M. Reinhardt (Schering AG Berlin, Abteilung Ultraschallkontrastmittel).

Die Farbe Grau des B-Bildes besteht aus den immer gleichen Anteilen von Rot, Grün und Blau. Um das farbige CPA-Bild vom B-Bild zu filtern, subtrahiert die Filterprozedur bei jedem Pixel zwei RGB-Anteile voneinander, wie Rot von Blau. Ist die Differenz größer als Null, sind beide Farbanteile nicht gleich groß, dann gehört dieses Pixel zu einer farbigen Signalfäche.

Es gibt im Ultraschallbild Bereiche, in denen niemals eine relevante Information zu finden ist, wie z.B. die Kopfzeile, in der die Patientendaten gespeichert sind. Um hier Rechenleistung einzusparen, können diese Bereiche mit der Software aus der Informationserfassung ausgeschlossen werden. Hier wurde ein Viereck um den Bereich der relevanten Information (region of interest, ROI) gelegt. Nur hier wurde die Bildinformation gefiltert und ausgewertet.

Das CPA-Signal stellt Flußintensität unabhängig von deren Richtung dar. Je heller die Farbe ist, um so höher ist die Flußintensität. Der RGB-Wert einer Farbe wird höher mit ansteigender Helligkeit. Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Analyseprogramm zählt die Pixel und mißt die Summe aller RGB-Werte innerhalb der ROI. Aus der Summe der RGB-Werte und der Anzahl der Pixel wird die mittlere Helligkeit eines Einzelpixels pro Bildfläche in der ROI bestimmt. Analysiert man auf diese Weise eine ganze Videosequenz, erhält man eine geordnete Reihe von Werten der mittleren Helligkeit (Abschnitt 8, Anhang). Werden diese Werte auf eine Zeitachse aufgetragen, erhält man eine Kurve, welche die Flußinformation eines Gefäßes oder mehrerer Gefäße im beobachteten Zeitraum beschreibt.

Nach der Injektion eines Ultraschallkontrastmittels erscheint das gemessene Gefäß heller und das farbige Areal wird größer (sogenanntes Color Blooming). Die Anzahl und Helligkeit der informationstragenden Pixel steigt und damit die durchschnittliche Helligkeit. Durch die Verwendung der durchschnittlichen Helligkeit wird der Effekt des Color Blooming minimiert.

Nach digitaler Aufnahme der Videoinformation, dem Filterprozeß und der Bestimmung der mittleren Helligkeit der Pixel in der ROI über die Untersuchungszeit, wurden die erhaltenen quantitativen Werte in eine Excel-Datei exportiert. Aus diesen Daten kann dann eine Kurve der mittleren Helligkeit über die Zeit, die Densitometrie-Kurve konstruiert werden und die Daten ausgewertet und in Diagrammen dargestellt werden. Die Einheit der Helligkeit ist die Density Unit (DU). Die maximale Helligkeit war in dieser Studie 8 Bit oder ein Byte, damit sind 256 Helligkeitsstufen, hier DU möglich (ca. 0,031 Bit sind 1 DU). Die Messung der Helligkeit erfolgte innerhalb einer vom Untersucher definierten region of interest (ROI) während der Zeit der Anflutung und des Auswaschens des USKM. Es wurde versucht, über mindestens 120 Sekunden zu messen.

Die ROI wurde wie folgt platziert: Nach Betrachten der gesamten digitalisierten Untersuchung wurde die ROI vom Untersucher so dicht wie möglich um eine Pixelfläche gelegt, die über einen langen Zeitraum einen Effekt des USKM erkennen ließ und wenig durch Bewegungsartefakte gestört war. Wenn durch Atem- oder andere Bewegungen der Patientin im Verlauf der Untersuchung die pulsierende Pixelfläche aus der ROI „rutschte“, mußte die ROI größer oder eine andere Pixelfläche gewählt werden (Abbildungen 7 und 8).

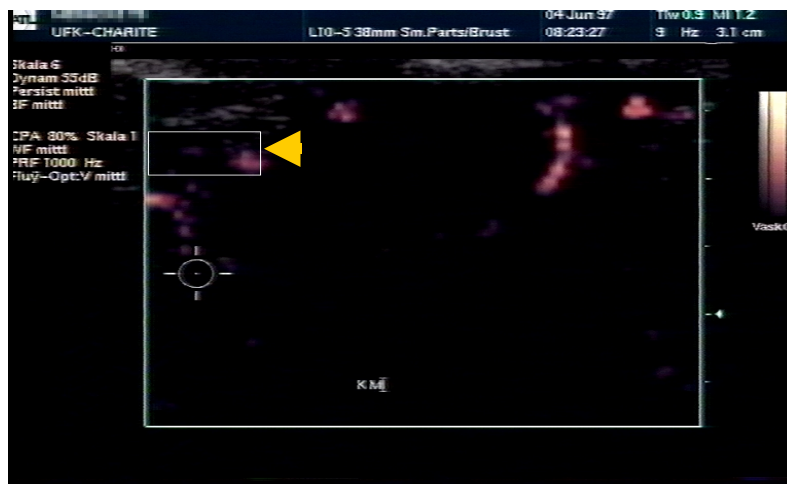


Abbildung 6: CPA-Bild vor der intravenösen Gabe des Ultraschallkontrastmittels Levovist® bei einem Mammakarzinom (pT3pN1G3M0, ER+, PR+). Der gelbe Pfeil zeigt auf die ROI, in der die Veränderung der CPA-Helligkeit im Blutgefäß unter Kontrastmittelgabe gemessen werden soll. Die Gesamtverstärkung des B-Bildes ist maximal zurückgenommen. Deshalb erscheint es schwarz.

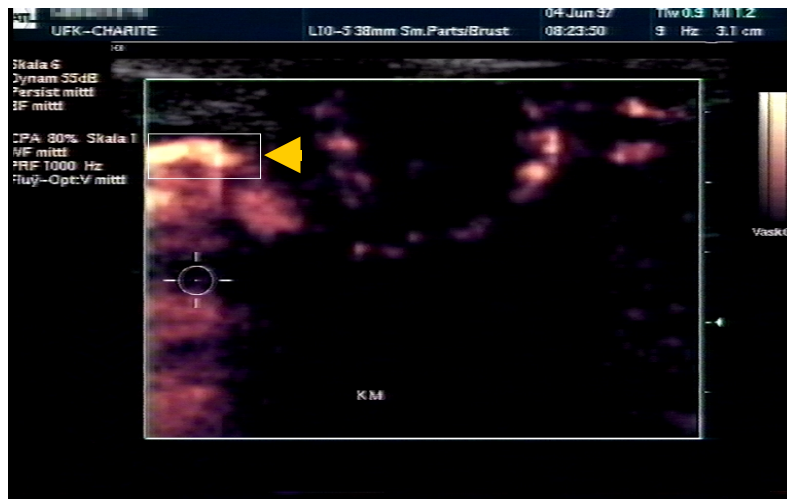


Abbildung 7: Maximaler Effekt des Levovist® auf das CPA-Bild nach der Gabe des Ultraschallkontrastmittels bei gleicher Patientin wie in Abbildung 6. In der ROI nehmen die Helligkeit und die Anzahl der Farbpixel zu.

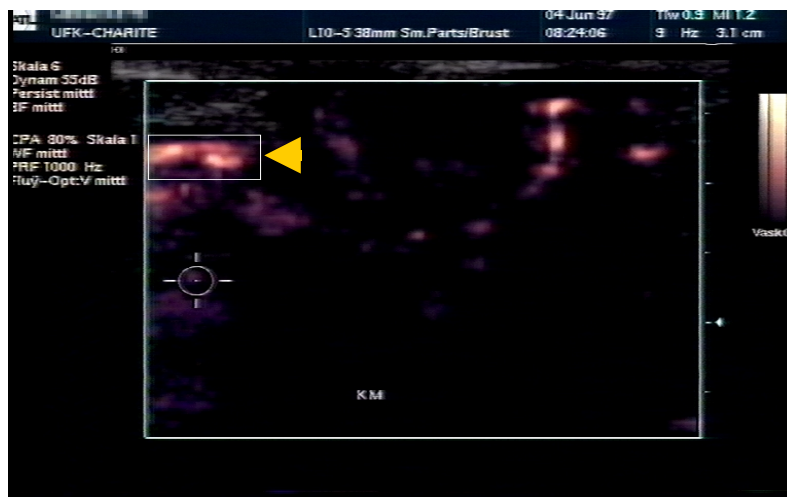


Abbildung 8: Abnehmender Effekt des Levovist® auf das CPA-Bild nach der Gabe des Ultraschallkontrastmittels bei gleicher Patientin wie in den Abbildungen 6 und 7.

Diese Messungen am eingescannten Bild des PC einschließlich der Positionierung der ROIs wurden von 3 unabhängigen Untersuchern nacheinander durchgeführt. Die interobserver variability der Bestimmung der mittleren maximalen Helligkeit pro Pixel (folgend als maximale Helligkeit bezeichnet), aus der sich die anderen Meßgrößen ableiten, lag pro Patientin unter 10%. Die resultierende Helligkeits-Zeit-Kurven wurden ausgedruckt (Abbildung 9 und Abschnitt 8, Anhang), die Parameter dieser Kurve wurden in eine Excel-Datei für die statistische Analyse importiert. Die gemessenen und berechneten Parameter der Helligkeits-Zeit-Kurven der Videodensitometrie wurden folgendermaßen definiert (Abbildung 9):

Characteristic timing parameters and magnitudes of brightness

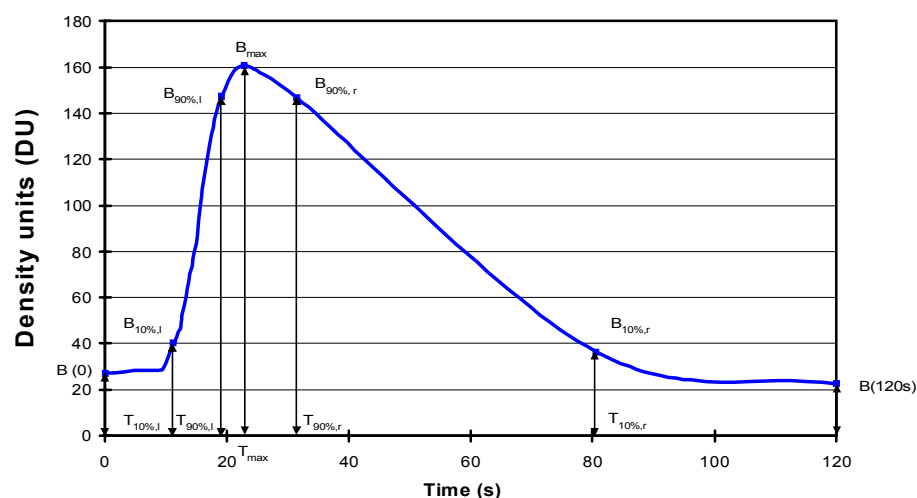


Abbildung 9: Zeit-Helligkeits-Kurve mit der Definition der charakteristischen Parameter

Zeitparameter:

$T_{10\%,l}$: Zeit bis zum Erreichen von 10% der maximalen Helligkeit, linke Seite des Peaks

$T_{90\%,l}$: Zeit bis zum Erreichen von 90% der maximalen Helligkeit, linke Seite des Peaks

T_{max} : Zeit bis zum Erreichen der maximalen Helligkeit

$T_{90\%,r}$: Zeit von der maximalen Helligkeit bis zum Erreichen von 90% der maximalen Helligkeit, rechte Seite des Peaks

$T_{10\%,r}$: Zeit von der maximalen Helligkeit bis zum Erreichen von 10% der maximalen Helligkeit, rechte Seite des Peaks

Helligkeitsparameter:

$B(0)$: Minimale Helligkeit (baseline der Helligkeit vor Einsetzen des USKM-Effektes)

$B_{10\%,l}$: 10% der maximalen Helligkeit während den Anflutens des USKM

$B_{90\%,l}$: 90% der maximalen Helligkeit während den Anflutens des USKM

B_{max} : Maximale Helligkeit

$B_{90\%,r}$: 90% der maximalen Helligkeit während den Auswaschens des USKM

$B_{10\%,r}$: 10% der maximalen Helligkeit während den Anflutens des USKM

$B_{(120s)}$: Helligkeit 120 Sekunden nach dem Beginn des USKM-Effektes

Berechnete Parameter:

„Zeit-und-Helligkeits-Parameter“:

$$T_{max} \times B_{max} / (B_{max} - B(0))$$

„wash-in-wash-out-Parameter“ (Anflutungs-Auswasch-Parameter:

$$(T_{90\%,l} - T_{10\%,l}) / (T_{10\%,r} - T_{90\%,r})$$

Statistische Untersuchungen: Die Unterschiede der Ausprägung der Zeit-, Helligkeits- und berechneten Parameter zwischen den beiden Gruppen (Mammakarzinome und benigne Läsionen) wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p < 0.05$) berechnet. Außerdem wurden die Sensitivität und Spezifität für die errechneten cut-off Werte zum Erreichen einer maximalen Spezifität kalkuliert.

3.2.3 Therapiemonitoring mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie

Das Ziel dieser Untersuchung war, mit der Methode der Videodensitometrie Veränderungen in der Durchblutung eines Mammakarzinoms unter einer Chemotherapie zu erkennen.

Untersucht wurde die Wertigkeit aller Parameter, mit denen bei der Studie zur Differentialdiagnose und Videodensitometrie (Abschnitt 3.2.2.) sicher zwischen benignen und malignen Herdbefunden unterschieden werden konnte.

Die Hypothese ist, daß es mit diesen Parametern der Videodensitometrie (T_{max} , $T_{90\%,l}$, „wash-in-wash-out-Parameter“, Zeit-und-Helligkeits-Parameter“) gelingt, Unterschiede in der Durchblutung zwischen den Karzinomen mit einem klinischen Ansprechen auf die Therapie (Komplette Remission (CR) und Partielle Remission (PR)) und denen, die kein Ansprechen zeigten (No change (NC) und Progression Disease (PD)) zu erkennen. Der Vergleich mit dem klinischen Ansprechen erfolgte, da das klinische Ansprechen immer noch international zum Vergleich der verschiedenen Therapien eingesetzt wird (73) und uns aus früheren Untersuchungen bekannt war, daß es keinen Zusammenhang zwischen dem klinischen Ansprechen und den histologischen Regressionsgraden nach Sinn et al. (82) gab

(69,70). Aus Gründen der Plausibilität der erhaltenen Ergebnisse wurden die gleichen Patientinnen außerdem mit der MRT untersucht und die Höhe des relativen Signalanstiegs unter der Therapie dokumentiert.

Patientinnen und Methodik: Für diese Untersuchungen wurden 6 Patientinnen mit einem Mammakarzinom (Stadium T3N1M0, ER+ bei allen Patientinnen) unter der präoperativen Chemotherapie (3 Zyklen mit Epirubicin 120 mg/m², gefolgt von 3 Zyklen mit Docetaxel 100 mg/m², Abstand 14 Tage, G-CSF von Tag 3-7 (83)) vor jedem Therapiezyklus mit der Densitometrie und der MRT untersucht.

Die Methodik der Densitometrie war die gleiche wie im Abschnitt 3.2.2. Zusätzlich zur Densitometrie wurde bei 6 dieser Patientinnen vor jedem Therapiezyklus eine MRT der Mammæ durchgeführt. Die kernspintomographischen Untersuchungen erfolgten mit einem Hochfeld MRT, 1,5 Tesla (ACN-NT 15, Philips, Einthoven, Holland und Magnetom SP 63, Siemens, Erlangen, Deutschland) im MRT-Labor der Strahlenklinik und Poliklinik der Charité (Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. R. Felix) im Campus Virchow-Wedding, in erster Linie durch die Herren Dres. H. Oellinger und C. Siewert. Die Datenerfassung erfolgte durch Herrn H. Wieder.

Die Methodik der MRT-Untersuchung war die gleiche wie im Abschnitt 3.1.3. Zu bestimmten Zeitpunkten (alle 75 Sekunden) wurde die absolute Signalintensität bestimmt und aus deren Verhältnis zur Signalintensität ohne Kontrastmittel der relative Signalanstieg in Prozent errechnet. Anschließend erfolgte die Gegenüberstellung beider Methoden zur Messung einer Kontrastmittelkinetik. Die Werte des relativen Signalanstiegs unter dem Kontrastmittel Gd-DTPA im MRT wurden in ihrem Verlauf unter der präoperativen Chemotherapie dargestellt und mit dem Verlauf der Werte der Ultraschall-Kontrastmittel-Videodensitometrie (mit dem Kontrastmittel Levovist®) verglichen.

Die Zielstellung dieser Studie war es, zu untersuchen, ob es möglich ist, Veränderungen der Parameter der Densitometrie und der MRT abhängig vom Ansprechen des Mammakarzinoms auf die präoperative Chemotherapie zu erkennen.

3.3 Tumervaskularisation und automatisierte Mikroskop-Bildanalyse (AMBA)

3.3.1 Vergleich der Tumordurchblutung mit der morphometrisch bestimmten Tumervaskularisation

Nachdem in den ersten Abschnitten dieser Arbeit (Abschnitte 3.1.1. bis 3.2.3.) die verschiedenen neueren Ultraschallmethoden zur Beurteilung der Tumordurchblutung untersucht wurden, interessiert jetzt die Tumervaskularisation, insbesondere der Vergleich der Tumervaskularisation mit der Tumordurchblutung bei einzelnen Patientinnen.

Folgende Hypothesen werden für diese Studie aufgestellt:

1. Es existieren signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Graden der dopplersonographisch gemessenen Durchblutung (Klasse I bis III, siehe Abschnitt 3.1.1.) hinsichtlich der Vaskularisation im histopathologischen Schnittpräparat. Dies betrifft insbesondere die größeren Gefäße, da hier der Blutfluß schnellerer und somit dopplersonographisch leichter erkennbarer sein soll.
2. Neben der Gefäßzahl eignen sich auch andere meßbare Gefäßcharakteristika wie Dicke der Gefäßwand, Gefäßinnenfläche (Gefäßlumenfläche) und Gefäßgesamtfläche zur Messung der Tumervaskularisation.

Patientinnen: Von 1994 bis 1996 wurden alle Patientinnen der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Campus Charité Mitte präoperativ mit der Farbdopplersonographie (CD) untersucht. Die Einteilung in die 3 Pixelklassen erfolgte prospektiv.

88 Patientinnen mit einem Mammakarzinom (68 mit einem invasiven duktalem und 20 mit anderen histologischen Typen des invasiven Mammakarzinoms) wurden präoperativ im Rahmen dieser Studie mit der Farbdopplersonographie (CD) untersucht. Die Ergebnisse der CD und die morphometrischen Untersuchungen von 34 dieser Patientinnen wurden für diese vergleichende Untersuchung beider Methoden aufgenommen. Diese 34 Frauen hatten ein invasives duktales Mammakarzinom und zeigten im CD eine homogene Durchblutung. Das bedeutete: In allen Ultraschallebenen konnten pulsierende Farbpixel im sonographischen Herdbefund gefunden werden. Karzinome, die dopplersonographisch nur an einem Rand des Herdbefundes (medial, lateral, kranial oder kaudal) pulsierende Pixel zeigten, wurden von der Studie ausgeschlossen. 28 der 34 ausgeschlossenen invasiven duktalem Mammakarzinome wiesen eine sonographisch erkennbare Durchblutung im Tumorrand und 6 im Tumorzentrum auf. Es erschien uns zu störanfällig, diesen Rand zu markieren und von dort die histologischen Schnitte für die Vaskularisationsanalyse anzufertigen. Deshalb haben

wir uns für diese Studie für die Stichprobe der sonographisch homogen durchbluteten Mammakarzinome entschieden.

Die Gruppe der invasiven dukalen Mammakarzinome wurde ausgewählt, um mögliche Einflüsse auf die Tumervaskularisation durch den histologischen Typ auszuschließen.

Die Stadienverteilung der Karzinome ist in Tabelle 6 angegeben. Die Hälfte der Karzinome war kleiner als 2 cm.

Tabelle 6: Verteilung der Tumorstadien (pT) und der histologischen Differenzierung (Grading) der 34 Patientinnen mit homogener Tumordurchblutung und einem invasiven dukalen Mammakarzinom

Tumorstadium (pT)	Patientinnen	Grading	Patientinnen
1a	1	1	8
1b	3	2	17
1c	13	3	9
2	13	4	0
3	1		
4a	1		
4b	0		
4c	0		
4d	2		

Das mediane Alter der Patientinnen war 55,4 Jahre.

Methodik: Die Untersuchungstechnologie, Geräteeinstellung, Definition der Herdbefunde, usw. war die gleiche wie in den Abschnitten 3.1.1. bis 3.1.2. Die Pixelklassen wurden ebenfalls gleich eingeteilt mit der Ausnahme, daß eine zusätzliche Pixelklasse 0 für die Herdbefunde ohne sichtbare Farbpixel in der Farbdoppleruntersuchung eingeführt wurde.

Die Verteilung der Pixelklassen war folgende:

Pixelklasse 0: N= 7,

Pixelklasse 1: N=3,

Pixelklasse 2: N=3,

Pixelklasse 3: N=21.

Die Auswahl der histologischen Schnitte für die Anti-CD34-Färbung erfolgte am Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt. Der Schnitt des Mammakarzinoms mit dem größten Anteil am invasiven Karzinom (Auswahl durch Frau Dr. U. Schneider, Pathologisches Institut der Charité, Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. Dietel) wurde für die Endothelfärbung und AMBA-Messung ausgewählt (Abbildungen 23 und 24). Die Anti-CD34-Färbung erfolgte am deparaffinisierten, rehydrierten, inkubierten (für 14 Minuten mit 3% H₂O₂ in destillierten Wasser), gepufferten und nochmals mit dem monoklonalen Antikörper für eine Stunde in feuchter Kammer und in Raumtemperatur inkubierten Präparat nach der labelled-streptavidin-biotin-Methode (LSAB, siehe Abschnitt 3.1.4.). Die primären Antikörper gegen CD34 waren die Antikörper Clone43A1, Ancell (verdünnt in tris-gepufferter Salzlösung (TBS) mit 1%igem bovinen Serum Albumin (BSA)). Die CD34-Färbung ist eine zytoplasmatische Färbung.

Die Analyse der gefärbten Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop Jenaval (Carl-Zeiss Jena GmbH), Vergrößerung 12,5 x 10. Die mikroskopischen Bilder wurden durch eine auf das Okular gesetzte 3Chip-CCD Videokamera (Sony 3CCD, D x C 930P) und einem Digitizer (Matrix-Comet image processing board, Matrox Electronic Systems Ltd., Canada) digitalisiert und in einen Pentium personal computer (PC) importiert und gespeichert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Komponenten des Bildverarbeitungssystems

Mikroskop:	Jenaval (Carl Zeiss Jena GmbH)
Kamera:	Sony 3 CCD- Color video Camera
Personal Computer:	CPU Pentium 100 MHz 32 MB RAM, MS DOS V 6.20 Windows for workgroups 3.11
Graphikkarte/ Framegrabber:	Matrox Comet
Bildverarbeitungssoftware:	AMBA (Dr. Hufnagl, IBSB GmbH, Berlin)

Das Messen und Auswerten der mikroskopischen Bilder erfolgte am PC mit einem speziell für diese Studie entwickelten Computer-Programm der automatisierten Mikroskop-Bildanalyse. Die Markierung der äußeren und inneren Gefäßwand der angefärbten Blutgefäße erfolgte manuell mit der PC-Mouse durch Frau A. Gohlke (jetzt Klinik für Urologie, Klinikum Berlin-Buch). Gefärbtes Stroma wurde nicht markiert. Zuerst wurde die innere Gefäßwand markiert, dann die äußere. Das Programm zeigte dann die markierten Regionen als farbige Flächen.

Die Parameter der Blutgefäße mit einem Durchmesser von über 100 μm wurden über die gesamte Tumoorfläche des ausgewählten Objektträgers bestimmt. Die Blutgefäße mit einem Durchmesser von unter 100 μm wurden in 10 zufällig gewählten Meßfenstern (Gesichtsfeldern) vermessen. Die Anzahl dieser kleinelumigen Gefäße pro Meßfenster ($270057 \mu\text{m}^2$ oder ca. $0,27 \text{ mm}^2$) schwankte zwischen 3 und 44. Entsprechend schwankten die Mittelwerte der Gefäßflächen von Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld. Durch die Vermessung von 10 zufällig gewählten Gesichtsfeldern mit insgesamt durchschnittlich 100 Gefäßanschnitten konnte der Variationskoeffizient der mittleren Gefäßzahl pro mm^2 , bei Mehrfachmessung des gleichen Präparates unter 15% gesenkt werden.

Folgende Vaskularisationsparameter wurden getrennt für die Gefäße mit einem Durchmesser von unter und über 100 μm bestimmt:

1. Anzahl der Gefäße pro mm^2
2. Mittlere Breite der Gefäßwand (in μm)
3. Mittlere innere Gefäßfläche (Lumenfläche, in μm^2)
4. Gesamtfläche aller Gefäße (in μm^2) im histologischen Schnitt
5. Gesamtfläche aller großen ($>100 \mu\text{m}$) und kleinen Gefäße ($<100 \mu\text{m}$) im histologischen Schnitt

Statistische Verfahren: Die mittleren Werte der oben genannten Parameter wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den Pixelklassen 0-4 mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben untersucht. Außerdem wurden die Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten ρ für den Zusammenhang zwischen den Durchblutungsklassen (Pixelklassen 0-3) und den Vaskularisationsparametern berechnet.

3.3.2 Prognose und Tumolvaskularisation

Im Abschnitt 3.1.2. wurde untersucht, ob mit der Farbdopplersonographie Aussagen zur Prognose der Patientin mit einem Mammakarzinom gemacht werden können. Im Abschnitt 3.3.1. wurde der Zusammenhang zwischen den Befunden der Farbdopplersonographie und der Tumolvaskularisation untersucht.

Die Hypothese ist jetzt, daß aus den Ergebnissen der morphometrisch bestimmbaren Parameter der Tumolvaskularisation Aussagen zur Prognose der Patientin mit einem Mammakarzinom gemacht werden können.

Patientinnen: Diese Untersuchungen wurden an den histologischen Präparaten der gleichen 34 Patientinnen mit einer homogenen Durchblutung und einem invasiven duktalen Mammakarzinom wie in der vorherigen Studie (Abschnitt 3.3.1.) durchgeführt.

Methodik: Es wurde die gleiche Gefäßfärbung wie in der vorhergehenden Studie (Abschnitt 3.3.1.) verwendet und die gleichen 5 Parameter der Vaskularisation, getrennt nach groß- und kleinelumigen Gefäßen bestimmt. Es wurde untersucht ob sich die Ausprägung dieser Parameter signifikant zwischen Patientinnen mit einer Lymphknotenmetastasierung (pN1) und denen ohne regionale Metastasierung (pN0) unterscheidet und ob die Vaskularisationsparameter von der Größe der Mammakarzinome abhängen.

Statistische Untersuchungen: Die Stärke des Zusammenhangs zwischen der Lymphknotenmetastasierung (pN1 vs. pN0) und den morphometrisch bestimmten Parametern der Vaskularisation wurde mit dem Spearman'schen Korrelationskoeffizienten ρ beschrieben. Für den Zusammenhang zwischen der Tumorgroße und der Tumolvaskularisation wurde der Produktmomentkorrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet.

3.3.3 Therapiemonitoring und Tumolvaskularisation

In den Abschnitten 3.1.4. und 3.2.3. wurde untersucht, wie sich die meßbare Tumordurchblutung in Mammakarzinomen unter der präoperativen Chemotherapie ändert. Die Hypothese dieser Studie ist, daß sich die morphometrisch meßbaren Parameter der Tumolvaskularisation unter der präoperativen Chemotherapie ändern.

Patientinnen: Von 19 Patientinnen (medianes Alter 55,7 Jahre, Range 38-74 Jahre) mit einem histologisch nachgewiesenen invasiven duktalem Mammakarzinom wurde von 1995 bis 1998 vor der präoperativen Chemotherapie eine Gewebeprobe (Biopsie) aus dem Tumor entnommen. An diesem Gewebe und an dem Gewebe des nach der Chemotherapie entnommenen Tumors wurden die Untersuchungen zur Vaskularisation durchgeführt, also an insgesamt 38 prä- und posttherapeutischen Gewebeproben.

Die Stadienverteilung und weitere Charakteristika der Karzinome sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Verteilung der Tumorstadien (pT) vor der Chemotherapie der 19 untersuchten Mammakarzinome und weitere Charakteristika dieser Patientinnen mit einer präoperativen Chemotherapie

Tumorstadium (cT)	Patientinnen	Grading	Patientinnen
cT1c	2	G1	1
cT2	4	G2	10
cT3	3	G3	8
cT4b	5		
cT4c	1		
cT4d	4		
Östrogen-/Progesteron-Rezeptor positiv	15	c-erbB2-positiv	14

Die Patientinnen erhielten Epirubicin 120 mg/m^2 über 3 Zyklen im Abstand von je 14 Tagen (nach jedem Zyklus G-CSF 50 µg von Tag 3 bis Tag 7), gefolgt von 3 Zyklen mit Docetaxel 100 mg/m^2 im Abstand von je 14 Tagen (nach jedem Zyklus G-CSF 50 µg von Tag 3 bis Tag 7).

Methodik: Die Methodik der Endothelfärbung, der AMBA und der Erfassung und Auswertung der Parameter der Tumolvaskularisation war die gleiche wie in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2. Die Auswahl der repräsentativen Schnitte erfolgte von Frau Dr. med. B. Fleige (Pathologisches Institut der Charité), die Markierung der CD34-gefärbten Gefäße durch Frau D. Laubersheimer (Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät).

In dieser Studie wurden folgende Parameter der Vaskularisation am Tumorgewebe vor der Chemotherapie (offene oder Hochgeschwindigkeitsbiopsie zur histologischen Sicherung des Mammakarzinoms) und nach der Chemotherapie (Gewebe aus dem Areal der prätherapeutischen histologischen Sicherung innerhalb des entfernten Brustsegmentes oder Mammaabladates) bestimmt und miteinander verglichen:

1. Anzahl der Gefäße pro mm^2
2. Mittlere Breite der Gefäßwand (in µm)

3. Mittlere innere Gefäßfläche (Lumenfläche, in μm^2)
4. Mittlere Gesamtgefäßfläche
5. Mittlerer innerer Umfang der Gefäße (in μm)
6. Mittlerer äußerer Umfang der Gefäße (in μm)

Es wurden alle CD34-gefärbten Tumorgefäße im ausgewählten und eingescannten histologischen Schnitt mit der Mouse markiert. Da die Gefäße insbesondere nach der Chemotherapie nicht homogen auf dem Objektträger verteilt waren, wurden nur die Regionen, in denen sich Gefäße anhand der CD34-Färbung nachweisen ließen, zur Analyse der Vaskularisation ausgewählt. Da großlumige Gefäße insbesondere die Messungen zur Gefäßfläche und zum Gefäßumfang pro mm^2 stark beeinflussen würden und ihre Verteilung ungleichmäßig war, wurden nur die Gefäße mit einem Lumen von unter $100\ \mu\text{m}$ in die Analyse aufgenommen. Nach den Ergebnissen der vorangegangenen Abschnitte (3.3.1. bis 3.3.2. bzw. 4.3.1. bis 4.3.2.) und der internationalen Literatur (Abschnitt 1) sind die Veränderungen der Tumorgefäße eher auf der Ebenen der kleinelumigen Gefäße der Mikrovaskularisation zu erwarten.

Da der Umfang die selten runden Tumorgefäße besser charakterisiert als deren über Formeln anhand des Durchmessers und einer angenommenen kreisrunden Form berechnete Flächen, wurde dieser Gefäßparameter in diese Analyse aufgenommen. Es wurde die Beobachtung während der Untersuchungen dieser Studie gemacht, daß sich die Form der Tumorgefäße unter der Therapie ändert. Diese Veränderungen lassen sich schwer beschreiben aber durch die Messung des Gefäßumfanges quantifizieren und vergleichen.

Statistische Verfahren: Die Mittelwerte der einzelnen Vaskularisationsparameter der kleinelumigen Gefäße pro mm^2 wurden vor und nach der Chemotherapie mit dem Paarvergleich auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) innerhalb der gesamten Patientinnengruppe untersucht. Zusätzlich wurde mit der gleichen Methode die Veränderung der Vaskularisationsparameter bei jedem histologischen Regressionsgrad untersucht, um Aussagen zur Veränderung der Vaskularisation abhängig von der pathologischen Remission zu erhalten. Vorher erfolgte im Sinne Plausibilitätsprüfung der Vergleich der Ergebnisse dieses Abschnittes mit denen der Abschnitte 3.3.1. und 3.3.2. Die Größenordnung der Gefäßparameter der vorangegangenen Studien (Abschnitte 3.3.1. - 3.3.2. und 4.3.1. – 4.3.2.) muß mit denen vor der Therapie dieser Studie (Abschnitte 3.3.3 und 4.3.3.) vergleichbar sein.

4 Ergebnisse

4.1 Farbdopplersonographie (CD)

4.1.1 Differentialdiagnose und Farbdopplersonographie (aus Blohmer et al. 1999 (39))

Anzahl der erkennbaren Blutflüsse (pulsierende Pixelflächen)

Bei 10 der 78 Patientinnen mit einem Mammakarzinom, die in diese Studie aufgenommen werden konnten, wurden mit dem Farbdoppler keine pulsierenden Pixel im sonographischen Herdbefund dargestellt, es war mit dieser Methode keine Tumordurchblutung nachzuweisen. Die Charakteristik dieser Mammakarzinome war: Invasives duktales Karzinom: N=9, invasives lobuläres Karzinom: N=1; pTis: N=1, pT1: N=7, pT2: N=1, pT3: N=1; pN0: N=7, pN1: N=2, pNX: N=1 (pTis); G1: N=2, G2: N=7, G3: N=1.

Bei 14 der in die Studie aufgenommenen 85 Patientinnen mit einem benignen Herdbefund war kein Blutfluß mit dem Farbdoppler im sonographischen Herdbefund darstellbar. Diese Herdbefunde setzten sich aus folgenden histologischen Tumortypen zusammen: Fibroadenome: N=2, eine Form der Mastopathie: N=12.

Bei den Patientinnen mit einem Mammakarzinom war die Anzahl der pulsierenden Pixelflächen signifikant höher als bei denen mit benignen Herdbefunden ($p < 0,003$, Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl der pulsierenden Pixelflächen (Blutflüsse) in malignen und benignen Herdbefunden

Anzahl der Pixelflächen	Mamma karzinom	Benigne Herdbefunde
Kein Fluß	10	14
1	16	38
2	29	22
>2	23	11

Lokalisation der pulsierenden Pixelflächen

In dieser Studie wurden bei den Patientinnen mit einem Mammakarzinom die pulsierenden Pixelflächen signifikant häufiger ($p < 0,0003$, Tabelle 10) im Herdbefund als in seiner Peripherie im Vergleich zu den benignen Herdbefunden registriert.

Tabelle 10: Anordnung der pulsierenden Pixelflächen im Herdbefund oder in seiner Peripherie bei Mammakarzinomen und benignen Herdbefunden

Anordnung der Pixelflächen	Mamma-karzinom	Benigne Herdbefunde
Kein Fluß	10	14
Tumorperipherie	23	53
Herdbefund	45	18

Pixelklassen

Pixelklasse I: Da es kaum möglich ist, bei einzelnen Farbpixeln zwischen Tumordurchblutung und Artefakten (Atmung der Patientin, Geräterauschen) zu unterscheiden, wurden in diese Gruppe auch die Patientinnen aufgenommen, in deren Herdbefund sich kein Blutfluß (N=24) darstellen ließ. Von den insgesamt 27 Patientinnen in dieser Gruppe der Pixelklasse I hatten 12 ein Mammakarzinom (insgesamt: N=78) und 15 einen benignen Herdbefund (insgesamt: N=85). Damit war diese Pixelklasse in beiden Gruppen gleich verteilt.

Pixelklasse II: Diese Pixelklasse war typisch für benigne Herdbefunde der Mamma. 40 der Patientinnen in dieser Pixelklasse hatten einen benignen Herdbefund, 11 ein Mammakarzinom.

Pixelklasse III: Signifikant häufiger ($p < 0,0002$) wurde diese Pixelklasse bei Mammakarzinomen

(N=55/78) registriert im Vergleich zu benignen Herdbefunden (N=30/85, Tabelle 11).

Tabelle 11: Farbpixelklassen bei benignen und malignen Herdbefunden der Mamma

Pixelklasse	Mamma- karzinom	Benigner Herdbefund
Keine Pixel + Klasse I	12	15
Klasse II	11	40
Klasse III	55	30

Mediane maximale systolische Geschwindigkeit (V_{\max}) und Resistance Index (RI)

Die mediane V_{\max} war in den Karzinomgefäßen signifikant ($p < 0,02$) höher (median 17,6 cm) als bei den benignen Herdbefunden (median 13,9 cm/s, Tabelle 12). Bei den benignen Läsionen lag die Range der V_{\max} in den Tumorgefäßen zwischen 4,2 und 37,8 cm/s, bei Mammakarzinomen zwischen 4,0 und 41,7 cm/s. Die mediane maximale systolische Geschwindigkeit der Blutgefäße im Spiegelbild-Quadranten der kontralateralen, nicht erkrankten Brust unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Dieses Ergebnis ist für die Bestimmung der kriteriumsbezogenen (V_{\max}) Validität und die folgende Analyse wichtig.

Bei den Patientinnen mit einem Mammakarzinom war die V_{\max} in den Tumorgefäßen signifikant ($p < 0,0003$) höher als in denen des Spiegelbild-Quadranten der kontralateralen Brust. Bei den Patientinnen mit einem benignen Herdbefund wurde dieser signifikante Unterschied nicht registriert.

Tabelle 12: Mediane maximale systolische Geschwindigkeit (in cm/s mit Angabe der Range) von malignen und benignen Herdbefunden in den Gefäßen des Herdbefundes und des Spiegelbild-Quadranten der kontralateralen Brust

	Herdbefund (Range)	Kontralaterale Brust (interquartäre Range)
Mamma- karzinom	17,6 (4,0 ... 41,7)	12,8 (2,8 ... 25,3)
Benigne Herdbefunde	13,9 (4,2 ... 37,8)	13,6 (4,1 ... 34,6)

Der RI als Maß für den peripheren Widerstand im Blutgefäß war innerhalb der Mammakarzinomgefäße signifikant ($p < 0,05$) höher als in den Gefäßen der benignen Herdbefunde (Tabelle 13). In den Gefäßen des Spiegelbild-Quadranten der kontralateralen Brust unterschied sich der RI wiederum nicht signifikant zwischen beiden Patientinnengruppen. Außerdem unterschied sich die Differenz dieses Parameters nicht zwischen den Tumorgefäßen und denen der kontralateralen Brust im Gegensatz zur V_{\max} .

Tabelle 13: Medianer Resistance Index (RI) und seine Range bei malignen und benignen Herdbefunden in den Gefäßen des Tumors und der kontralateralen Brust

	Herdbefund (Range)	Kontralaterale Brust (interquartäre Range)
Mammakarzinom	0,72 (0,4 ... 0,96)	0,7 (0,5 ... 0,88)
Benigne Herdbefunde	0,69 (0,48 ... 0,87)	0,69 (0,51 ... 0,87)

4.1.2 Prognose und Farbdopplersonographie (aus Blohmer et al. 1998 (130))

Zunächst wurden die Beziehungen zwischen den etablierten Prognosefaktoren untereinander untersucht.

Große Karzinome hatten auch in dieser Untersuchung signifikant häufiger Lymphknotenmetastasen als kleinere Mammakarzinome (Tabelle 14). Die mediane Karzinomgröße von Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen lag bei 18 mm. Die mediane Karzinomgröße von Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen betrug 22 mm.

Tabelle 14: Tumorgöße und Lymphknotenmetastasierung der 99 untersuchten Mammakarzinome

Tumorgöße	pN0	pN1a	pN1b	pN2-pN3	Gesamt
pTis-pT1	38	3	11	2	54
pT2	10	5	14	2	31
pT3-pT4	3	2	7	2	14
Gesamt	51	10	32	6	99

Beim Grading überwogen mittelgradig differenzierte Mammakarzinome (51/99). Die pT2-Karzinome waren signifikant häufiger gering differenziert (G3) als die pT1-Karzinome. Von den pT1-Karzinomen waren 13% gering differenziert (G3), von den pT2-Karzinomen 23% und von den pT3/pT4-Karzinomen 36%. Lymphknotenpositive Mammakarzinome waren in dieser Untersuchung signifikant häufiger gering differenziert als die lymphknotennegativen (pN0 und G2-3: 65%, pN1 und G2-3: 86%).

Beim Östrogen- und dem Progesteronrezeptorstatus gab es bei der Tumorgöße, dem Lymphknotenstatus und der Tumordifferenzierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien in dieser Patientinnengruppe.

4.1.2.1 Tumorgöße (pT) und Farbdopplersonographie

Maximale systolische Geschwindigkeit und Resistance Index

Die verschiedenen Tumorgößen (3 Gruppen: pTis/pT1a, pT2, pT3/pT4) unterschieden sich hinsichtlich der medianen maximalen systolischen Geschwindigkeiten nicht signifikant voneinander. Eine Tendenz zu höheren Geschwindigkeiten mit zunehmender Tumorgöße war jedoch festzustellen (Tabelle 15). Ebenso gab es in der Höhe des peripheren Widerstandes in den Gefäßen der Mammakarzinome keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tumorgößen aber eine tendenzielle Zunahme des medianen Resistance Index mit steigender Tumorgöße (Tabelle 15).

Anzahl der erkennbaren Blutflüsse (pulsierende Pixelflächen)

Beim Vergleich der Anzahl der Pixelflächen innerhalb der drei pT-Gruppen (pTis/pT1, pT2 und pT3/pT4) bestand ein schwach signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen ($p=0,048$). Mit zunehmender Tumorgöße nahm also die Anzahl der darstellbaren pulsierenden Pixelflächen im Herdbefund signifikant zu. Im getrennten Vergleich zwischen nur jeweils 2 Gruppen ließ sich dieser signifikante Unterschied nur zwischen pT1 und pT3 erkennen: (pT1 / pT2: $p=0,14$; pT1 / pT3: $p=0,03$; pT2 / pT3: $p=0,12$) (Tabelle 15).

Lokalisation der pulsierenden Pixelflächen

In kleinen Karzinomen (pT1) wurden die Pixelflächen gleich häufig in der Peripherie des sonographisch dargestellten Karzinoms wie in der Tumorfäche beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten die Karzinome im Stadium pT3 in 73% der Fälle die Pixelflächen nur in der Tumorfäche. Trotzdem konnte in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied in der Anordnung der Pixelflächen zwischen den Tumorgößen festgestellt werden (Tabelle 15).

Pixelklassen

Zwischen den verschiedenen Karzinomgrößen bestand hinsichtlich der Pixelklassen I bis III in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied (Tabelle 15). Von der Tumorgöße hing es also nicht ab, ob und wie viele pulsierende Pixelflächen erkannt werden konnten. Die Bedeutung dieser Aussage wird beim Lesen des nächsten Abschnittes zum Zusammenhang zwischen den Pixelklassen und der Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen erkennbar.

Tabelle 15: Verschiedene Parameter der Farbdopplersonographie und Tumorgröße

CD-Parameter	pT1s-pT1	pT2	pT3-4
Mediane Vmax (cm/s)	18,7	23,7	25,3
Medianer RI	0,7	0,75	0,8
1 und mehr Pixelflächen	31/40++	25/26+	10/11+
Keine Pixelfläche	7/40+	1/26	1/11
Pixelflächen in Tumor- fläche	15/40	14/26	8/11
Pixelflächen in Tumor- peripherie	14/40	14/26	2/11
Pixelklasse I	9/40	1/26	1/11
Pixelklasse II und III	31/40	25/26t	10/1

+ p<0,05

4.1.2.2 Lymphknotenmetastasierung (pN) und Farbdopplersonographie

Maximale systolische Geschwindigkeit und Resistance Index

Zwischen den lymphknotenpositiven (pN1) und lymphknotennegativen (pN0) Mammakarzinomen in dieser Untersuchung bestand hinsichtlich der medianen maximalen systolischen Geschwindigkeit und des medianen RI kein signifikanter Unterschied. Die genauen Werte für jede Gruppe der Lymphknotenmetastasierung (pN0 - pN3) sind in Tabelle 16 aufgeführt. Zusammengefaßt betrug die mediane maximale systolische Geschwindigkeit bei metastatisch befallenen Lymphknoten (pN1a-pN3) 21,8 cm/s und bei nicht befallenen Lymphknoten (pN0) 21,6 cm/s. Der Unterschied war nicht signifikant. In der Höhe des medianen Resistance Index (RI) bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen pN1a-pN3 (RI=0,7) und pN0 (RI=0,72).

Tabelle 16: Verschiedene Parameter der Farbdopplersonographie und Lymphknotenmetastasierung

CD-Parameter	pN0	pN1a	pN1	pN2-3
Mediane Vmax (cm/s)	21,6	23	20,9	23,4
Medianer RI	0,72	0,73	0,74	0,63
1 und mehr Pixelflächen	24/34+	9/10+	21/25+	4/5+
Keine Pixelfläche	7/34+	0/10+	2/25+	0/5+
Pixelflächen in Tumorfläche	11/34	8/10	13/25	3/5
Pixelflächen in Tumorperipherie	12/34	1/10	8/25	1/5
Pixelklasse I	9/34+	0/10+	2/25+	0/5+
Pixelklasse II und III	25/34+	10/10+	23/25+	5/5+

+ $p < 0,05$

Anzahl der darstellbaren Blutflüsse (pulsierende Pixelflächen)

Es bestand nur ein schwach signifikanter Unterschied zwischen lymphknotenpositiven (pN1a-pN3) und -negativen (pN0) Patientinnen hinsichtlich der Anzahl der mit der CD darstellbaren Blutflüsse in einer Ebene (Tabelle 16).

Anordnung der Pixelflächen im sonographisch darstellbaren Mammakarzinom

Aus der Lokalisation des darstellbaren Blutflusses (Tumorperipherie oder -fläche) konnte nicht präoperativ auf eine Lymphknotenmetastasierung geschlossen werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen lymphknotenpositiven und -negativen Patientinnen hinsichtlich der Anordnung der pulsierenden Pixelflächen im sonographischen Herdbefund (Tabelle 16).

Pixelklassen

Es fanden sich bei 18% der Patientinnen mit der Klasse I Lymphknotenmetastasen, jedoch bei 54% der Patientinnen mit Klasse II und bei 63% der Patientinnen mit Klasse III (darunter bei den einzigen Patientinnen mit pN2 und pN3, Tabelle 16). Vergleicht man die Dichte der Durchblutung im Tumorareal (Pixelklassen) bei lymphknotenpositiven Frauen und bei lymphknotennegativen Frauen ohne nähere Differenzierung so stellt man einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden fest ($p=0,008$, Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben). 74% der Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen wiesen die Pixelklassen II und III auf gegenüber von 95% der Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen. Der getrennte Vergleich von jeweils nur zwei verschiedenen Durchblutungsklassen miteinander zeigt, daß der eigentliche Unterschied zwischen der Gruppe mit fehlendem Blutfluß/einzelnen Farbpixeln (mögliche Artefakte), also Klasse I, und der Gruppe mit reichlich nachweisbarem Blutfluß, Klasse III, besteht ($p=0,006$), nicht beim Vergleich der Klasse I mit der Klasse II ($p=0,18$) und auch nicht beim Vergleich der Klasse II mit der Klasse III ($p=0,27$) (Abbildungen 3 bis 5).

4.1.2.3 Histologisches Grading (G) und Farbdopplersonographie

Maximale systolische Geschwindigkeit und Resistance Index

Zwischen den histologischen Differenzierungsgraden der untersuchten Mammakarzinome bestanden in bezug auf die gemessene maximale Geschwindigkeit signifikante Unterschiede. Die mediane maximale systolische Geschwindigkeit nahm mit abnehmender Differenzierung des Mammakarzinoms

zu ($p=0,003$). Die Höhe des peripheren Widerstandes, hier des medianen Resistance Index, unterschied sich nicht signifikant zwischen den Differenzierungsgraden des Mammakarzinoms (Tabelle 17).

Tabelle 17: Verschiedene Parameter der Farbdopplersonographie und histologisches Grading

CD-Parameter	G1	G2	G3
Mediane Vmax (cm/s)	14,7++	19,6++	35,5++
Medianer RI	0,7	0,72	0,76
1 und mehr Pixelflächen	3/15	7/43	1/15
Keine Pixelfläche	12/15	36/43	10/15
Pixelflächen in Tumorfläche	4/15	25/43	7/15
Pixelflächen in Tumorperipherie	8/15	10/43	3/15
Pixelklasse I	3/15	7/43	1/15
Pixelklasse II und III	12/15	36/43	14/15

++ $p<0,005$

Anzahl der darstellbaren Blutflüsse (pulsierende Pixelflächen)

Es wurden in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Differenzierungsgraden hinsichtlich des Merkmals „Blutfluß“ bzw. „pulsierende Farbpixel sichtbar oder nicht sichtbar“ festgestellt (Tabelle 17).

Anordnung der Pixelflächen im sonographisch darstellbaren Mammakarzinom

Die Anordnung der Pixelflächen in der Tumorfläche oder -peripherie zeigte keine signifikanten Unterschiede in bezug auf das Grading der untersuchten Mammakarzinome. In der Tendenz waren die Karzinome gering differenziert, bei denen die Pixelflächen in der Tumorfläche mit der CD nachweisbar waren (Tabelle 17).

Pixelklassen

Auch bei der Zuordnung der Pixelklassen I bis III wurden bei den untersuchten Patientinnen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Differenzierungsgraden 1 bis 3 erkannt. Der Großteil der untersuchten Karzinome war jedoch auch mittelgradig differenziert (G2: N=43) (Tabelle 17).

Östrogen- und Progesteronrezeptoren und Farbdopplersonographie

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den rezeptorpositiven und - negativen (Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurden getrennt untersucht.) Mammakarzinomen bezüglich der medianen maximalen systolischen Geschwindigkeit, des RI, der Anzahl der pulsierenden Pixelflächen, der Lokalisation dieser Pixelflächen und bezüglich der Pixelklassen.

4.1.3 Vergleich der Farbdopplersonographie mit der Magnetresonanztomographie (MRT) in der Differentialdiagnose

Zunächst wurde untersucht ob die MRT in der Lage ist, zwischen malignen (27 Patientinnen) und benignen Herdbefunden (10 Patientinnen) in dieser Untersuchung zu unterscheiden. Dazu wurden die quantitativen Parameter der Signalintensitäts-Zeitkurven ausgewertet (Tabelle 18) und graphisch mit der Kennzeichnung von Mittelwert und Streuung dargestellt (Abbildung 10).

Interactions and 95.0 Percent Confidence Intervals

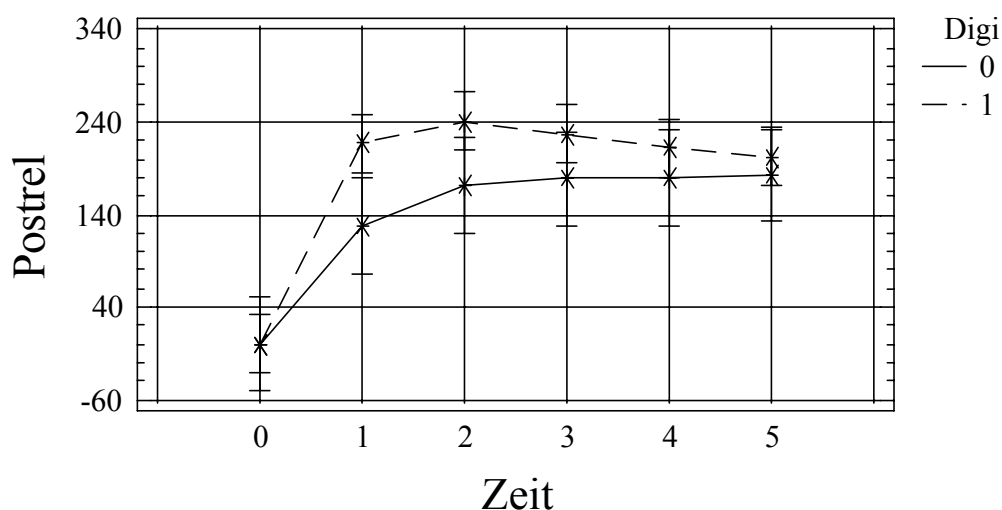


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Mittelwerte und Streuung (95% Confidence Intervall) der relativen Signalintensitätszunahme (Postrel) über die Zeit (1 entspricht 75 Sekunden usw.) nach Injektion des MRT-Kontrastmittels Gd-DTPA (Digi 0: Benigne Befundem, Digi 1: Mammakarzinome)

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichung der absoluten MRT-Signalintensität der malignen und benignen Herdbefunde vor (Prä KM) und nach (Post KM) Gabe des Kontrastmittels Gd-DTPA (KM)

Herdbefund	Prä KM	1. Post KM	2. Post KM	3. Post KM	4. Post KM
Mammakarzinom	41,9±20	123±53,4	138,9±54,8	134,5±66,3	127,5±61,3
Benigne Läsionen	38,7±18,1	36,7±16,7	80,3±21,6	82,3±23	82±26,2

Bei malignen und benignen Herdbefunden stiegen die absoluten Signalintensitäten nach Kontrastmittelgabe an. Die Steilheit des Anstieges und die Höhe des Anstieges unterschied sich signifikant zwischen beiden Gruppen (Tabelle 18). Die Werte der relativen Signalintensitätszunahme unterschieden sich signifikant zwischen benignen und malignen Herdbefunden in dieser Studie nur zum Zeitpunkt 1 (1. Messung nach der Kontrastmittelgabe, Anflutung, $p=0,005$, Abbildung 10), nicht jedoch zu den Zeitpunkten 0 (Messung vor der Kontrastmittelgabe) und Zeitpunkt 2 (2. Messung, 150 Sekunden, nach Kontrastmittelgabe, $p=0,07$), Zeitpunkt 3 ($p=0,08$), Zeitpunkt 4 ($p=0,1$) und Zeitpunkt 5 ($p=0,13$).

Beim Farbdoppler konnte in dieser Studie eine Tendenz ($p=0,17$) zu höheren maximalen systolischen Geschwindigkeiten bei Mammakarzinomen (mittlere $V_{\max} = 15,4 \text{ cm/s} \pm 9,1 \text{ cm/s}$) als bei benignen Herdbefunden (mittlere $V_{\max} = 11,1 \text{ cm/s} \pm 6 \text{ cm/s}$) festgestellt werden (Abbildung 15), für einen signifikanten Unterschied ist hier die Anzahl der untersuchten Patientinnen ($N=37$) bei der hohen Streuung der Werte zu gering.

Gleiches traf auch für die minimale enddiastolische Geschwindigkeit zu. Sie unterschied sich nicht signifikant ($p=0,22$) zwischen den Mammakarzinomen (mittlere $V_{\min} = 4,2 \text{ cm/s} \pm 2,6 \text{ cm/s}$) und den benignen Herdbefunden (mittlere $V_{\min} = 3,1 \text{ cm/s} \pm 1,6 \text{ cm/s}$).

Nach diesen Ergebnissen muß die diagnostische Aussagefähigkeit der relativen Signalintensität der

MRT höher als die V_{\max} der CD eingeschätzt werden. Zum direkten Vergleich beider Methoden in der klinischen Praxis, in der zusätzlich andere bildmorphologische Parameter beurteilt werden, sei auf die Einleitung dieser Arbeit verwiesen (Abschnitt 1.2.1.).

Für die Untersuchung von Korrelationen zwischen den Ergebnissen der beiden bildgebenden Methoden wurde zunächst bei den 36 Mammakarzinomen der 27 Patientinnen die Anreicherungsmorphologie des Kontrastmittels in der Magnet-resonanztomographie (MRT) mit der dopplersonographischen Pixel(Gefäß)-lokalisation verglichen. Dabei zeigten von den 11 Herdbefunden mit einer randförmigen Gefäß- bzw. Flußlokalisation im MRT in der CD 8 Herdbefunde pulsierende Pixelflächen im Randbereich der Herdbefunde (73%). Eine Übereinstimmung der beiden Methoden bei der Lokalisation der Pixelflächen in der Tumorfläche und der Peripherie wurde in 6 von 10 Fällen beobachtet (60 %, Tabelle 19).

Tabelle 19: Pixellokalisation in der Farbdopplersonographie und Anreicherungs-morphologie des Kontrastmittels in der Magnetresonanztomographie (36 Karzinome)

AM-MRT**	Pixel CD*		
	Peripherie	Tumorfläche	Tumor + Peripherie
Peripherie	8	1	2
Tumor + Peripherie	1	3	6
Homogen	1	5	1
Inhomogen	4	4	0

*Pixel CD: Pixellokalisation in der Farbdopplersonographie

**AM-MRT: Anreicherungsmorphologie des Kontrastmittels in der Magnetresonanztomographie
Anschließend sollte untersucht werden, ob die quantitativen Parameter „Relativer Signalanstieg“ der MRT und die V_{\max} der CD miteinander korrelieren. Aufgrund der Ergebnisse der Analyse zur diagnostischen Aussagefähigkeit beider Parameter wäre keine zwingende Korrelation zu erwarten.

Abbildung 11: Zusammenhang zwischen V_{\max} und der Zunahme der relativen Signalintensität im MRT nach Kontrastmittelgabe zu verschiedenen Zeitpunkten (V_{\max} in cm/s, Postrel in Sekunden).

- Zunächst wurde die V_{\max} mit dem relativen Signalanstieg im MRT nach Kontrastmittelgabe zu den untersuchten Zeitpunkten der Messung der Signalintensität verglichen (Abbildung 12):
 -Zeitpunkt 1: $r = 0,3$. Keine signifikante Korrelation mit V_{\max} ($p = 0,07$),
 -Zeitpunkt 2: $r = 0,33$. Schwache signifikante Korrelation mit V_{\max} ($p = 0,05$),
 -Zeitpunkt 3: $r = 0,36$. Signifikante Korrelation mit V_{\max} ($p = 0,03$),
 -Zeitpunkt 4: $r = 0,35$. Signifikante Korrelation mit V_{\max} ($p = 0,03$),
 -Zeitpunkt 5: $r = 0,35$. Signifikante Korrelation mit V_{\max} ($p = 0,04$).

Nach dem Nachweis einer signifikanten Korrelation zwischen dem relativen Signalanstieg im MRT und der V_{\max} im CD, wurde diese Berechnung noch mal getrennt für die malignen und benignen Herdbefunde durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Methoden konnte nur bei den benignen Herdbefunden ($p = 0,03$) und nicht bei den malignen Herdbefunden ($p = 0,38$) festgestellt werden.

4.1.4 Therapiemonitoring und Farbdopplersonographie

Im Referenz-Tumorgefäß, in dem die Dopplerparameter unter der präoperativen Chemotherapie mit Epirubicin und Ifosamid über 8 Wochen gemessen wurden, nahm die mediane V_{\max} nicht signifikant zu ($p = 0,2477$, Tabelle 20).

Tabelle 20: V_{\max} in cm/s vor und nach der präoperativen Chemotherapie

	Mediane V_{\max}	Interquartäre Range
vor Therapie	16,1	11,5 ... 26,45
nach Therapie	28,3	17,5 ... 39,35

Der mediane Resistance Index (RI) nahm unter der präoperativen Chemotherapie ebenfalls nicht signifikant ($p=0,2405$) ab (Tabelle 21).

Tabelle 21: RI vor und nach der präoperativen Chemotherapie

	Medianer RI	Interquartäre Range
vor Therapie	0,7	0,62 ... 0,79
nach Therapie	0,66	0,6 ... 0,71

Die maximale Anzahl der pulsierenden Pixelflächen in einer Tumorebene blieb bei 5 der 16 Patientinnen unter der Chemotherapie konstant, bei den anderen nahm deren Anzahl zu. Unter den 16 untersuchten Patientinnen konnte bei drei Patientinnen keine Änderung der Tumorgroße klinisch festgestellt werden (no change, NC), bei den anderen 13 Patientinnen ging der Tumor klinisch um mehr als 50% zurück (partielle Remission, PR). Es wurde keine klinische und keine histologische Komplettremission beschrieben (histologische Regressionsgrade: 3: N=1, 2: N=0, 1 und 0: N=15). Da nur drei Tumoren nicht auf die Chemotherapie ansprachen, gelang es nicht, einen Zusammenhang zwischen der Remission und den Ergebnissen der CD zu erkennen.

4.2 Ultraschall-Kontrastmittelsonographie (Videodensitometrie)

4.2.1 Color Power Angiomode (CPA) im Vergleich zur Farbdopplersonographie (CD)

Bei den Mammakarzinomen (N=36) zeigten sich in dem CPA im Vergleich zur CD bei 13 Patientinnen deutlich mehr pulsierende Pixelflächen, bei 6 Patientinnen mehr und bei 11 weniger erkennbare Blutflüsse. Bei 6 Untersuchungen zeigten sich keine quantitativen Unterschiede in der Anzahl der Pixelflächen zwischen CPA und CD (Abbildung 11).

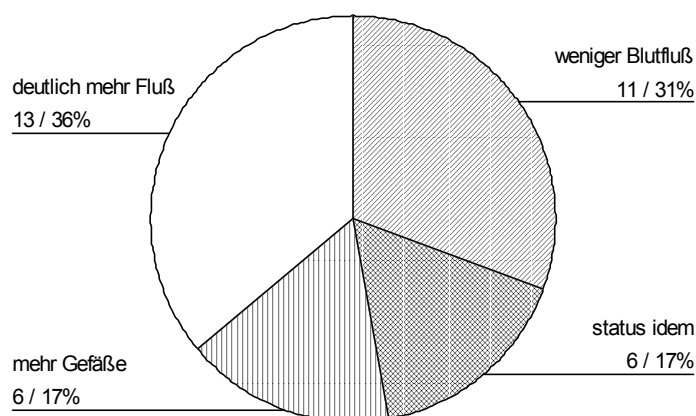


Abbildung 11: CPA im Vergleich zur CD bei 36 Mammakarzinomen

Bei den benignen Mammaläsionen (N=14) fiel der Vergleich zwischen beiden Methoden der Durchblutungsmessung etwas anders aus als bei den Mammakarzinomen. Bei keiner Patientin

zeigten sich deutlich mehr Pixelflächen. Von den benignen Herdbefunden wiesen 11 mehr, 3 weniger und 2 die gleiche Anzahl Pixelflächen im CPA im Vergleich zur CD auf. Bei 4 Patientinnen konnte der Untersucher mit beiden Methoden keinen Blutfluß darstellen (Abbildung 12).

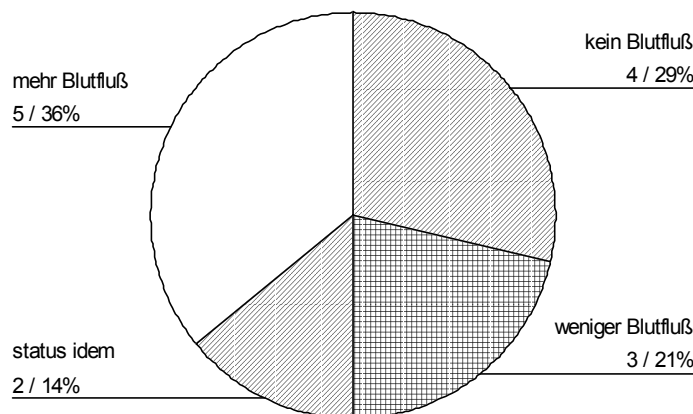


Abbildung 12: CPA im Vergleich zur CD bei 14 benignen Herdbefunden

Insgesamt war der CPA bei den Mammakarzinomen empfindlicher als die CD im Erkennen einer Tumordurchblutung. Es konnten signifikant mehr ($p < 0,05$) pulsierende Pixelflächen mit dem CPA als mit der CD im sonographischen Herdbefund dargestellt werden.

Interessant war eine zusätzliche Beobachtung während dieser Untersuchung. In Mammakarzinomen konnten mit dem CPA in 17 Fällen ein senkrechter, in 11 Fällen ein irregulärer, anarchischer und in 8 Fällen ein in Relation zur Thoraxwand parallel und hierarchischer „Gefäßverlauf“ erkannt werden.

4.2.2 Differentialdiagnose mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie

Als Beispiel für die Menge an quantitativen Daten der Densitometrie, die aus der Aufzeichnung mit dem S-VHS-Videoband, dem Scannen und Bearbeiten dieser Bildinformation gewonnen wurden, ist im Anhang (Abschnitt 8) der komplette Datensatz mit daraus konstruierter Graphik aus dem Mammakarzinom einer Patientin dargestellt.

Mit Ausnahme der Dignität, der histologischen Typen und des medianen Alters der Patientinnen waren beide Untersuchungsgruppen vergleichbar, so daß Unterschiede in der meßbaren Durchblutung nur durch die verschiedenen histologischen Typen und eventuell durch das Alter der Patientin bedingt sein können. Die Abhängigkeit des Mammakarzinoms vom Alter der Frau ist typisch und läßt sich durch keinen Versuchsaufbau vermeiden.

Im Vergleich zu den benignen Herdbefunden zeigte die Ultraschall-Kontrastmittelkinetik in der Videodensitometrie bei Mammakarzinomen einen schnellen Signalanstieg und eine hohe Signalintensität (Helligkeit, Abbildungen 6 bis 8 im Abschnitt 3.2.2.). Die Zeitparameter der Videodensitometrie wie $T_{90\%, 1}$, T_{\max} zeigten ebenso wie die berechneten Parameter signifikante Unterschiede in ihrer Ausprägung zwischen den beiden Untersuchungsgruppen (Tabelle 23). Bei den Mammakarzinomen waren die Zeiten bis zum Erreichen der maximalen Helligkeit (T_{\max} , $p = 0,006$) und die Zeit bis zum Erreichen von 90% der maximalen Helligkeit ($T_{90\%, 1}$, $p = 0,005$) signifikant kürzer als bei den benignen Herdbefunden. Der berechnete „wash-in-wash-out time-Parameter“ ($p = 0,02$) war bei den Mammakarzinomen ebenfalls signifikant kleiner als bei den benignen Herdbefunden. Und weil T_{\max} in die Berechnung des „Zeit-Amplituden-Parameters“ eingeht, ist auch dieser Parameter bei den Mammakarzinomen signifikant ($p = 0,003$) kleiner als in der Gruppe der benignen Herdbefunde. Das mit dem CPA dargestellte Blutflußsignal wurde nach Levovist® Applikation bei den Mammakarzinomen nicht signifikant heller als bei den benignen Herdbefunden. Diese Zahlen drücken quantitativ den visuellen Eindruck des Unterschiedes der Helligkeit-Zeit-Kurven (Abbildungen 13 und 14) zwischen malignen und benignen Herdbefunden aus.

Die cut-off Werte der Zeit- und errechneten Parameter wurden so gelegt, daß eine möglichst hohe Spezifität der Videodensitometrie erreicht werden konnte. Der Parameter mit der höchsten Spezifität war der berechnete „Zeit-Amplituden-Parameter“ (Spezifität von 92%, Sensitivität von 73% für einen cut-off Wert von $\leq 28,4$ Sekunden, Tabelle 22, Abbildung 15), gefolgt vom gemessenen Parameter $T_{90\%, 1}$ (Spezifität von 92%, Sensitivität von 64% für einen cut-off Wert von ≤ 20 Sekunden) und T_{\max} und dem „wash-in-wash-out time Parameter“.

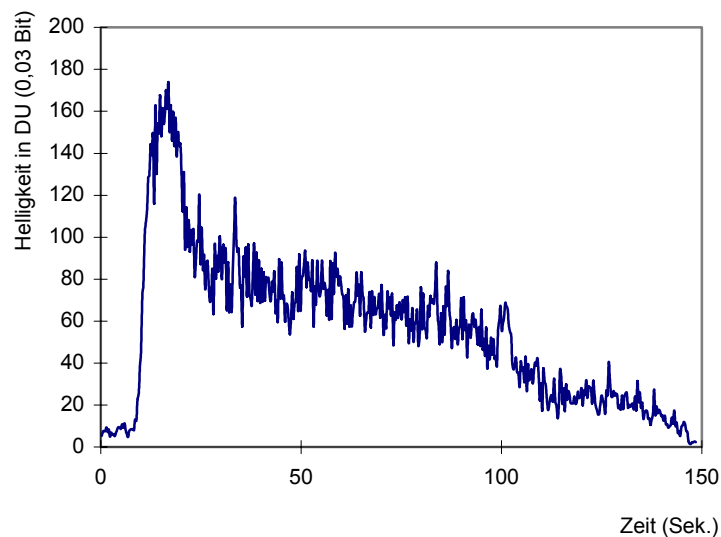


Abbildung 13: Typische Zeit-Helligkeits-Kurve der Kontrastmittel-Videodensitometrie eines Mammakarzinoms (pT3pN1G3M0, siehe Abbildungen 6 bis 8).

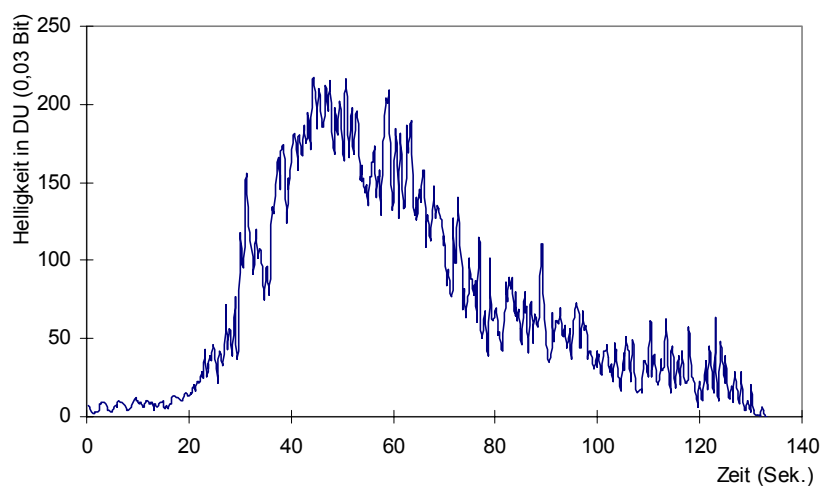


Abbildung 14: Abbildung 20: Typische Zeit-Helligkeits-Kurve der Kontrastmittel-Videodensitometrie eines benignen Herdbefundes der Mamma (Fibroadenom)

Tabelle 22: Charakteristische Parameter der Videodensitometrie für Mammakarzinome und benigne Herdbefunde (Median und interquartäre Range, Wilcoxon-Man-Whitney Test)

Parameter	Mammakarzinom	Benigne Herdbefunde	p-Wert
Zeitparameter			
$T_{10\%, l}$	10,0 (8,0...14,0) Sek.	16,5 (9,5...21,5) Sek.	p=0,08
$T_{90\%, l}$	18,5 (14,0...22,0) Sek.	26,0 (21,5...40,5) Sek.	p=0,005
T_{max}	22,0 (18,0...25,9) Sek.	35,0 (23,0...44,0) Sek.	p=0,006
$T_{90\%, r}$	28,0 (22,0...36,0) Sek.	44 (28,0...53,0) Sek.	p=0,06
$T_{10\%, r}$	81,0 (56,0...100,0) Sek.	73,0 (59,0...119,0) Sek.	p=0,99
Helligkeits (Intensitäts)- parameter			
$B_{(0)}$	26,0 (9,0...34,0) DU	14,0 (4,5...36,5) DU	p=0,30
B_{max}	166,5 (122,0...202,0) DU	147,5 (71,0...175,5) DU	p=0,14
$B_{(120s)}$	15,0 (6,0...35,0) DU	22,0 (7,5...61,5) DU	p=0,36
Berechnete Parameter			
$T_{max}(s) \cdot \frac{B_{max}}{B_{max} - B_{(0)}}$ ("Zeit-Amplituden- Parameter")	26,0 (21,8...30,1) Sek.	42,8 (32,5...49,6) Sek.	p=0,003
$\frac{T_{90\%, l} - T_{10\%, l}}{T_{10\%, r} - T_{90\%, r}}$ ("wash-in-wash- out-time Parameter")	0,19 (0,07...0,29)	0,32 (0,21...0,76)	p=0,02

Tabelle 23: Spezifität und Sensitivität und cut-off Werte der wichtigsten Parameter der Videodensitometrie

Parameter	Cut-off Wert	Sensitivität	Spezifität
$T_{90\%, I}$	≤ 20 Sek.	64%	92%
T_{\max}	≤ 28 Sek.	67%	91%
„Zeit-Amplituden-Parameter“	$\leq 28,4$ Sek.	73%	92%
„wash-in wash-out-time-Parameter“	$\leq 0,23$	68%	75%

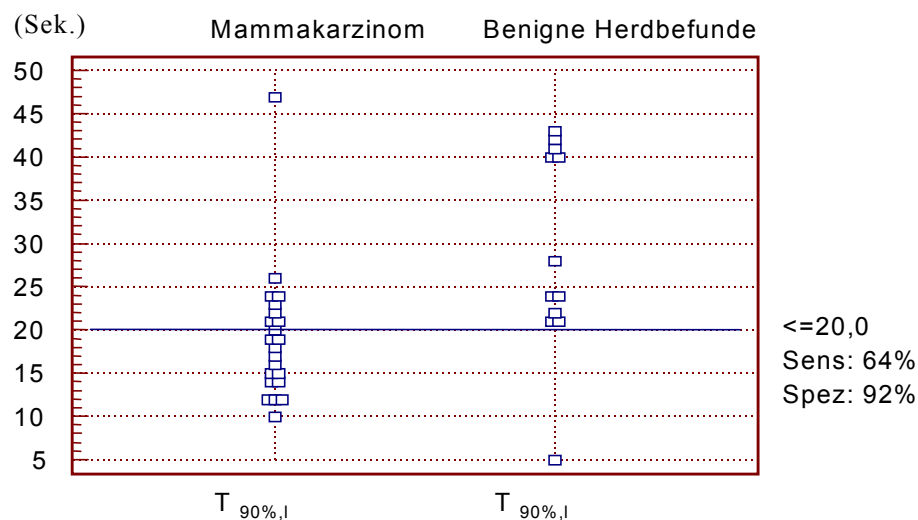


Abbildung 15: Werteverteilung bei Mammakarzinomen und benignen Herdbefunden und die berechnete Spezifität und Sensitivität des Parameters $T_{90\%, I}$ bei einem cut-off Wert von ≤ 20 Sekunden

4.2.3 Therapiemonitoring mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie

Von den präoperativ behandelten Patientinnen mit einem T3-Mammakarzinom zeigten zwei Patientinnen kein Ansprechen auf die Therapie (NC: N=2), drei Patientinnen eine partielle Remission (PR: N=3) und eine Patientin eine komplette Remission (CR: N=1).

Beim Betrachten der Werte der Densitometrie unter der Chemotherapie fällt auf, daß sich bei klinischer Remission die zunächst für ein Karzinom typischen Parameter den Parametern benigner Herdbefunde annäherten. Die Zeiten T_{\max} und besonders $T_{90\%, I}$ wurden länger (5/6) als Quantifizierung der Beobachtung, daß der Signalanstieg nach der Levovist®-Gabe weniger steil, also langsamer in den Mammakarzinomen mit einer klinischen Remission verläuft. In den Karzinomen, die kein Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie zeigten, änderte sich die Anflutungszeit nicht oder wurde sogar länger (Tabellen 23-24). Ebenso verhielt es sich mit dem „wash-in-wash-out-time-Parameter“ und besonders dem „Zeit-und-Helligkeits-Parameter“. Sie wurden kleiner oder blieben beinahe gleich bei Patientinnen, die auf die Chemotherapie nicht ansprachen und wurden größer bei

klinischer Remission (Tabellen 25-26).

Tabelle 24: Veränderung der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Helligkeit (T_{\max}) vor und nach der präoperativen Chemotherapie, gemessen mit der Videodensitometrie nach der Injektion von Levovist®

Pat.-Name	Klinische Remission	Histolog. Regression	T_{\max} vor Chemotherapie	T_{\max} nach Chemotherapie
V.O.	NC	2	28	28
W.I.	PR	0	22	56
W.E.	NC	1	58	120
M.E.	PR	2	16	15
W.A.	PR	1	80	11
A.S.	CR	2	22	56

Tabelle 25: Veränderung der Zeit bis zum Erreichen von 90% der maximalen Helligkeit ($T_{90\%, I}$) vor und nach der präoperativen Chemotherapie, gemessen mit der Videodensitometrie nach der Injektion von Levovist®

Pat.-Name	Klinische Remission	Histolog. Regression	$T_{90\%, I}$ vor Chemotherapie	$T_{90\%, I}$ nach Chemotherapie
V.O.	NC	2	17	22
W.I.	PR	0	14	52
W.E.	NC	1	51	119
M.E.	PR	2	12	13
W.A.	PR	1	77	8
A.S.	CR	2	19	46

Tabelle 26: Veränderung des „Zeit-und-Helligkeits-Parameters“ vor und nach der präoperativen Chemotherapie, gemessen mit der Videodensitometrie nach der Injektion von Levovist®

Pat.-Name	Klinische Remission	Histolog. Regression	"Zeit-u.-Helligkeits-P." vor Chemotherapie	"Zeit-u.-Helligk.-P." nach Chemotherapie
V.O.	NC	2	36,7	31
W.I.	PR	0	22	66
W.E.	NC	1	111,25	120
M.E.	PR	2	16,5	47,15
W.A.	PR	1	89,6	17,9
A.S.	CR	2	30,6	56

Tabelle 27: Veränderung des „wash-in-wash-out-Parameters“ vor und nach der präoperativen Chemotherapie, gemessen mit der Videodensitometrie nach der Injektion von Levovist®

Pat.-Name	Klinische Remission	Histolog. Regression	" wash-in-wash-out-Parameter " vor Chemotherapie	" wash-in-wash-out-Parameter" nach Chemotherapie
V.O.	NC	2	0,14	0,31
W.I.	PR	0	0,06	1,1
W.E.	NC	1	Nicht meßbar	0,034
M.E.	PR	2	0,02	0,35
W.A.	PR	1	0,25	0,028
A.S.	CR	2	1,17	Nicht meßbar

„Nicht meßbar“ bedeutet hier, daß die Länge der Auswaschkurve nicht meßbar war, da die Rückkehr zur Basallinie nicht erkennbar war. Die Ursache war bei beiden Patientinnen das „Wegrutschen“ der Pixelfläche aus der ROI. Eine Vergrößerung der ROI führte zu einer relativen kleinen Farbfläche in der großen ROI und damit zu einer zu geringen Beeinflussung der mittleren Helligkeit durch die Helligkeit der Farbpixel.

Auch bei der Veränderung der relativen Signalintensität nach Kontrastmittelgabe beim MRT ist eine Veränderung der Kontrastmittelkinetik unter der präoperativen Chemo-therapie bei den gleichen Patientinnen, die auch mit der Kontrastmittel-Video-densitometrie untersucht wurden, zu beobachten. Die relative Signalintensität nach der Gabe von Gd-DTPA nimmt deutlich bei einer kompletten (CR) und partiellen Remission (PR) ab, weniger deutlich bei einem No Change (NC).

Tabelle 28: Veränderung des maximalen relativen Signalintensitätsanstiegs in % im Mamma-MRT vor der ersten und nach der letzten präoperativen Chemotherapie, gemessen nach der Injektion von Gd-DTPA, Magnevist®

Patn.-Name	Klinische Remission	Histolog. Regression	Rel. Signalint. MRT vor Chemotherapie	Rel. Signalint. MRT nach Chemotherapie
V.O.	NC	2	216	208
W.I.	PR	0	168	135
W.E.	NC	1	288	177
M.E.	PR	2	282	55
W.A.	PR	1	113	55
A.S.	CR	2	136	77

Die Veränderungen in der Kontrastmittelkinetik beider Methoden sind im intraindividuellen Vergleich abhängig vom klinischen Ansprechen.

4.3 Tumervaskularisation und automatisierte Mikroskop-Bildanalyse (AMBA)

4.3.1 Vergleich der Tumordurchblutung mit der morphometrisch bestimmten Tumervaskularisation

Auch wenn die dopplersonographische Durchblutungsmessung keinen Blutfluß im Karzinom nachweisen konnte (Pixelklasse 0), wurde in jedem histologischen Präparat nach der Endothelfärbung mit CD34-Antikörpern eine Tumervaskularisation nachgewiesen.

4.3.1.1 Blutgefäße mit einem Durchmesser von $> 100 \mu\text{m}$

Die mittlere Anzahl dieser mittels CD34-Färbung gefärbten, manuell markierten und mit der AMBA gezählten größeren Gefäße (pro mm^2 in Klammern) war bei den Mammakarzinomen, die mit der CD in die Pixelklasse 0 (Abbildung 16) eingeordnet wurden: 0,85 (0,31) und in der Pixelklasse 3 (Abbildung 17): 4,28 (1,59). Es gab einen relativ engen Zusammenhang (Korrelationskoeffizient $\rho=0.46$) zwischen der Anzahl der großlumigen Blutgefäße (Parameter der Vaskularisation) und den Pixelklassen (Parameter der Durchblutung). Mit ansteigender Pixelklasse nahm die Anzahl dieser Blutgefäße zu (Abbildung 18). Hinsichtlich der Anzahl der Blutgefäße mit einem Durchmesser $> 100 \mu\text{m}$ gab es zwischen den Pixelklassen hoch signifikante Unterschiede ($p=0,0003$). Faßt man die Pixelklassen 0 und 1 in eine Gruppe und 2 und 3 in eine zweite Gruppe zusammen, ergaben sich hinsichtlich der morphometrisch bestimmten Gefäßzahl immer noch signifikante Unterschiede ($p=0,004$) zwischen diesen beiden gebildeten Gruppen.

Die Wanddicke der großlumigen Tumorgefäße unterschied sich nicht signifikant zwischen den sonographischen Pixelklassen ($p>0,6$). Die mittlere Wanddicke der Pixelklasse 0 war $10,3 \mu\text{m}$, die der Klasse 1: $3,5 \mu\text{m}$, die der Klasse 2: $5,5 \mu\text{m}$ und die der Klasse 3: $13,8 \mu\text{m}$. Der Korrelationskoeffizient war $\rho=0.34$.

Die mittlere innere Gefäßfläche (Lumenfläche) war in ihrer Größe ebenfalls nicht signifikant verschieden zwischen den Pixelklassen ($p>0,1$). Die mittlere innere Gefäßfläche der Pixelklasse 0 war $208,5 \mu\text{m}^2$, die der Klasse 1: $254,9 \mu\text{m}^2$, die der Klasse 2: $289,6 \mu\text{m}^2$ und die der Klasse 3: $231,1 \mu\text{m}^2$. Der Korrelationskoeffizient betrug $\rho=-0.2$.

Es gab aber signifikante Unterschiede ($p=0,001$, Abbildung 19) zwischen den Pixelklassen hinsichtlich der mittleren Gefäßgesamtfläche. Die mittlere Gesamtgefäßfläche der Pixelklasse 0 betrug $3535,3 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 3: $25.438,0 \mu\text{m}^2$. Der Korrelationskoeffizient zwischen Gesamtgefäßfläche und Pixelklasse der großlumigen Gefäße betrug $\rho=0.43$.

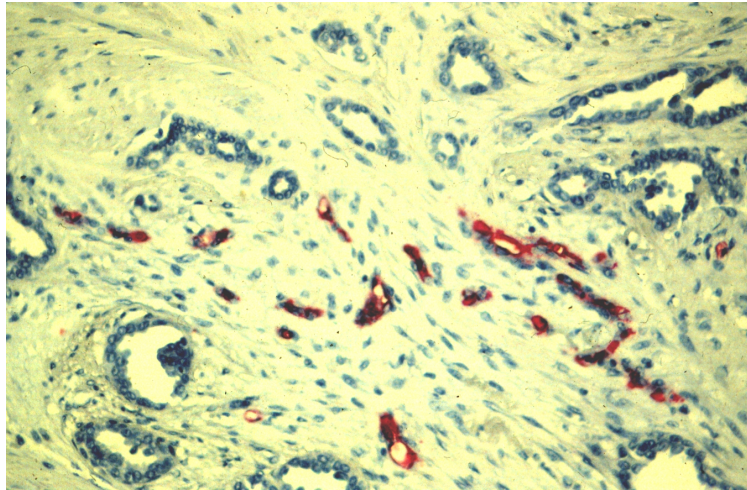


Abbildung 16: Mikroskopisches Bild (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, HE, Vergrößerung 400x) und CD34-Färbung der Gefäßwände (Rotfärbung) eines invasiven duktalen Mammakarzinoms pT1cN0G1, ER+ PR+. Sonographisch entsprach dieser Tumor einer Pixelklasse 1. Vergleiche die Gefäßanzahl mit der von Abbildung 19.

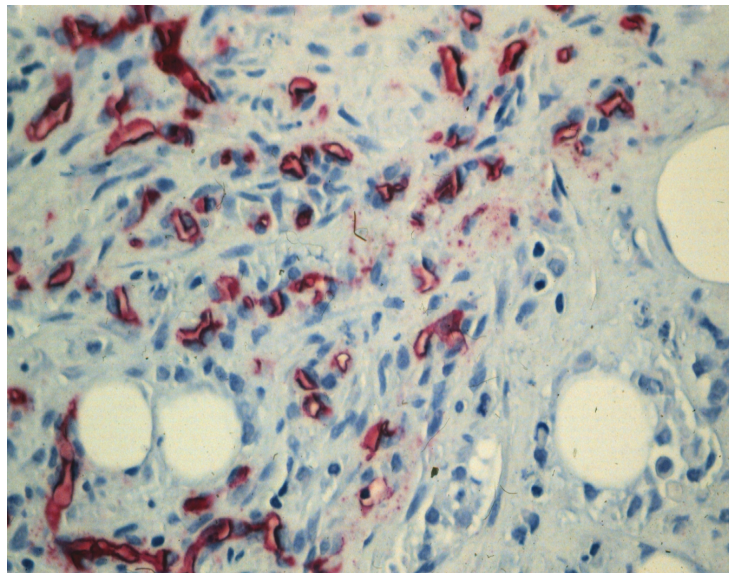


Abbildung 17: : Mikroskopisches Bild (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, HE, Vergrößerung 400x) mit CD34-Färbung der Gefäßwände (Rotfärbung) eines invasiven duktalen Mammakarzinoms pT2pN1G2, ER+ PR+. Sonographisch entsprach dieser Tumor einer Pixelklasse 3. Vergleiche die Gefäßanzahl mit der von Abbildung 23.

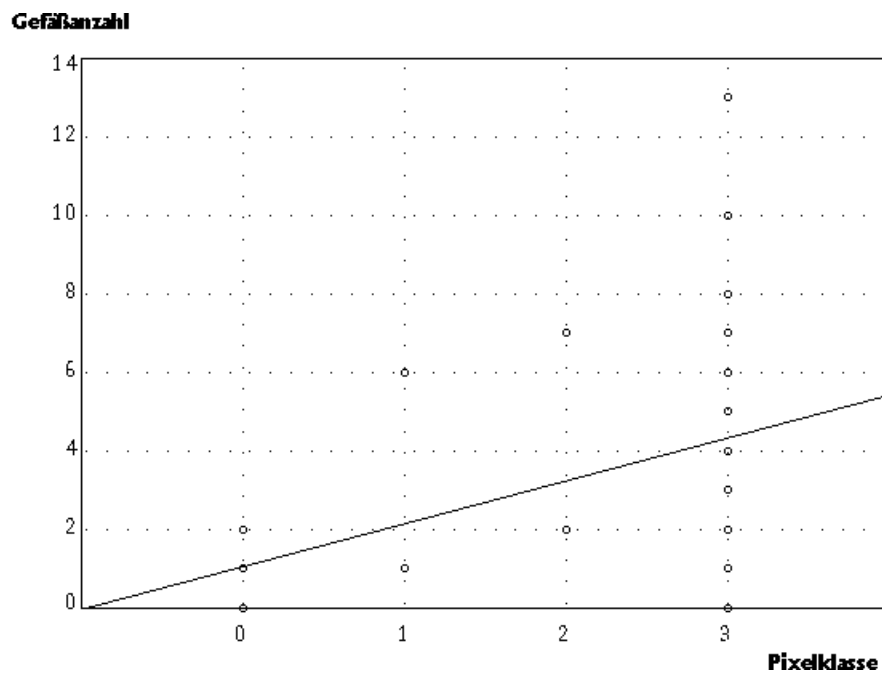


Abbildung 18: Anzahl der Blutgefäße mit einem Durchmesser > 100 μm und dopplersonographische Pixelklasse

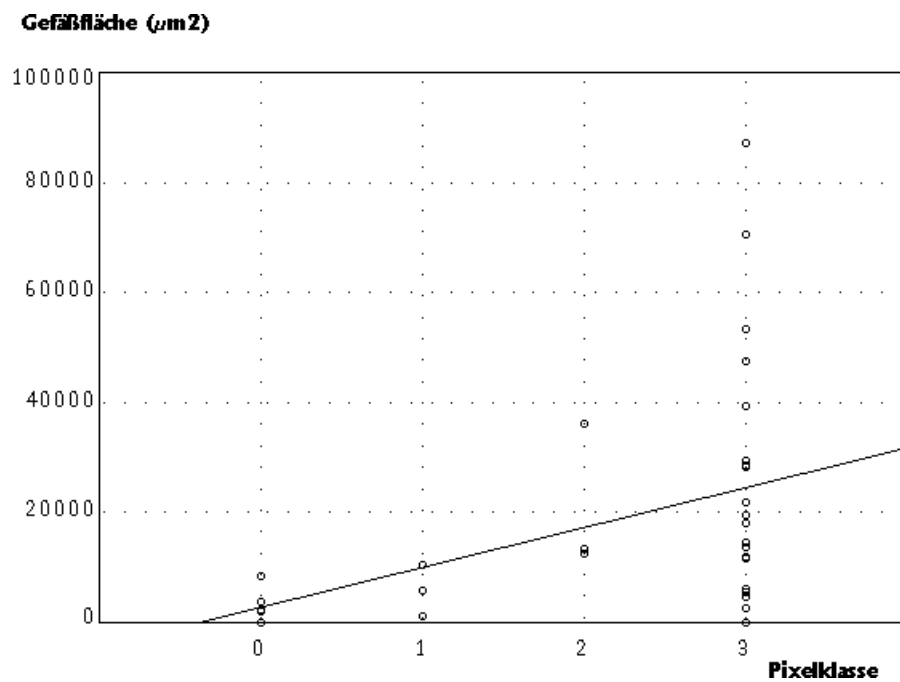


Abbildung 19: Gefäßgesamtfläche der Blutgefäße mit einem Durchmesser > 100 μm und dopplersonographische Pixelklasse

4.3.1.2 Blutgefäße mit einem Durchmesser von < 100 μm

Bei den kleinumigen Blutgefäßen konnte mit der hier eingesetzten Methode kein signifikanter Unterschied zwischen den Pixelklassen hinsichtlich der mittleren Anzahl der Gefäße festgestellt

werden ($p > 0,9$, Abbildung 20). Die mittlere Anzahl der kleinen Tumorgefäße (pro mm^2 in Klammern) der Pixelklasse 0 war 94,4 (35), der Pixelklasse 1: 144,3, (53,4) der Pixelklasse 2: 269,6 (99,9), der Pixelklasse 3: 93,4 (34,6). Der Korrelationskoeffizient war $\rho = -0.18$.

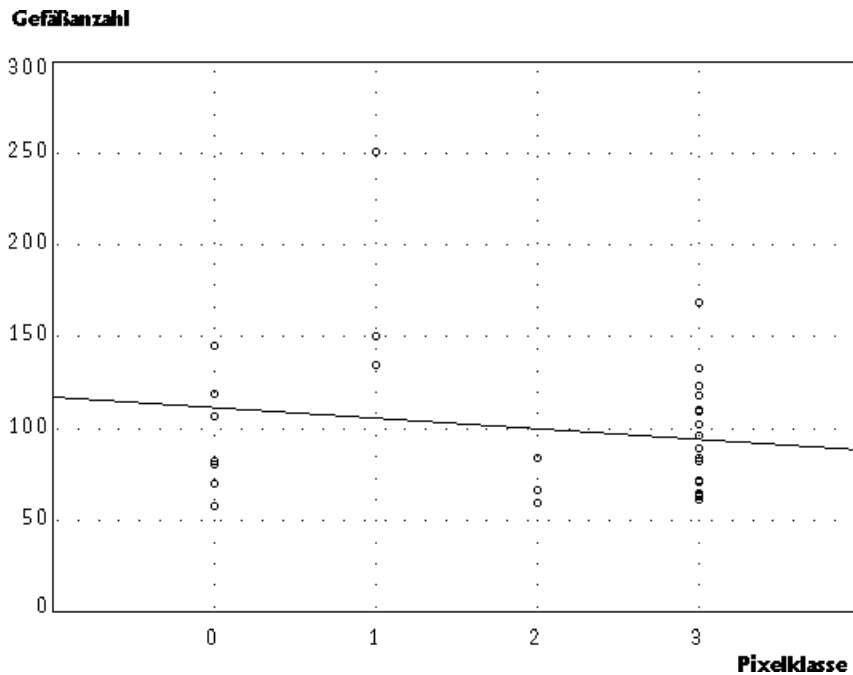


Abbildung 20: Anzahl der Blutgefäße mit einem Durchmesser $< 100 \mu\text{m}$ und Pixelklasse

Die mittlere Gefäßwanddicke der kleinlumigen Gefäße nahm signifikant zu mit jeder steigenden Pixelklasse und mit den zusammengefaßten Pixelklassen. Zum Beispiel war die Dicke der Gefäßwand zwischen der Gruppe der zusammengefaßten Pixelklassen 0 und 1 und der Gruppe der zusammengefaßten Pixelklassen 2 und 3 signifikant verschieden ($p < 0,009$). Die mittlere Gefäßwanddicke betrug in den Mammakarzinomen der Pixelklasse 0: $2,64 \mu\text{m}$, der Pixelklasse 1: $1,98 \mu\text{m}$, der Pixelklasse 2: $3,74 \mu\text{m}$ und der Pixelklasse 3: $3,20 \mu\text{m}$. Der Korrelationskoeffizient war $\rho = 0.26$.

Die mittlere innere Gefäßfläche der kleinlumigen Gefäße unterschied sich signifikant zwischen den einzelnen Pixelklassen, z.B. zwischen den Pixelklassen 0 und 3 ($p < 0,016$), 1 und 3 ($p < 0,02$), ebenso wie zwischen den zusammengefaßten Pixelklassen 0 und 1 und 2 und 3 ($p < 0,004$, Abbildung 21). Die mittlere Gefäßinnenfläche der Pixelklasse 0 war $147,2 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 1: $191,6 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 2: $200,2 \mu\text{m}^2$ und der Pixelklasse 3: $266,2 \mu\text{m}^2$. Der Korrelationskoeffizient zwischen den Durchblutungs-klassen und dem Vaskularisationsparameter Gefäßinnenfläche betrug $\rho = 0.31$.

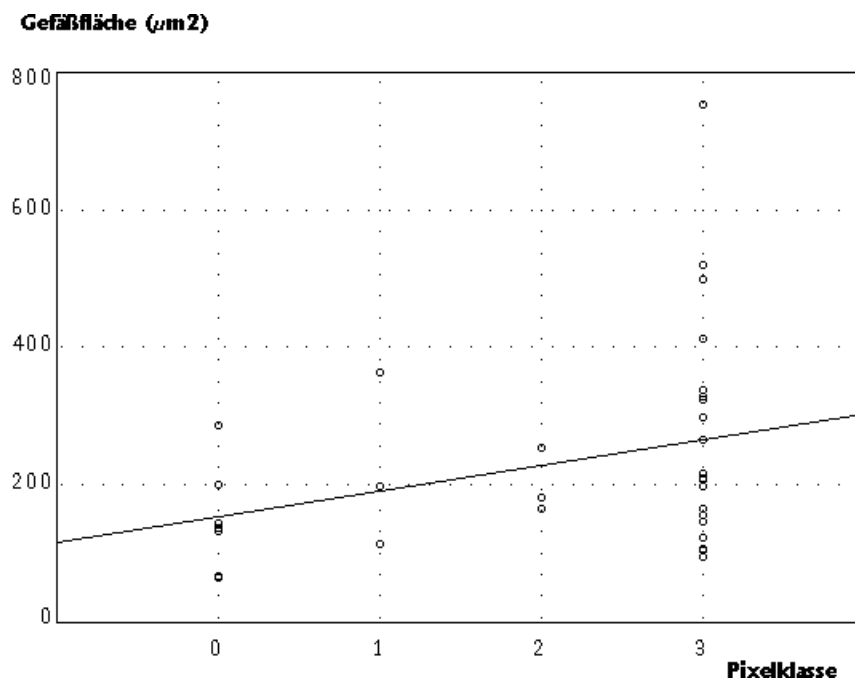


Abbildung 21: Gefäßinnenfläche (Lumenfläche) und Pixelklasse der Blutgefäße mit einem Durchmesser < 100 µm

Die mittlere äußere Gefäßfläche unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen den Pixelklassen 0 und 3 ($p < 0,018$), ebenso wie zwischen den zusammengefaßten Pixelklassen in 2 Gruppen ($p < 0,04$). Die mittlere äußere Gefäßfläche der Pixelklasse 0 war: $322,7 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 1: $304,5 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 2: $436,5 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 3: $530 \mu\text{m}^2$. Der Korrelationskoeffizient zwischen diesem Parameter der Vaskularisation und den Pixelklassen betrug $\rho = 0.4$.

4.3.1.3 Blutgefäße mit einem Durchmesser von > 100 µm und < 100 µm zusammen

Die großen und kleinen Blutgefäße insgesamt unterschieden sich signifikant zwischen den Karzinomen der einzelnen Pixelklassen hinsichtlich der mittleren Gesamtgefäßfläche aller Gefäße (z.B. zwischen der Pixelklasse 0 und 3, $p < 0,007$, Abbildung 22). Die mittlere Gesamtgefäßfläche der Mammakarzinome der Pixelklasse 0 war: $17120,1 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 1: $33544 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 2: $34393,1 \mu\text{m}^2$, der Pixelklasse 3: $48069,0 \mu\text{m}^2$.

Insgesamt gab es bei den meisten Parametern der Vaskularisation, insbesondere bei den kleinelumigen Tumorgefäßen, einen engen Zusammenhang zu den Ergebnissen der dopplersonographischen Durchblutungsmessung.

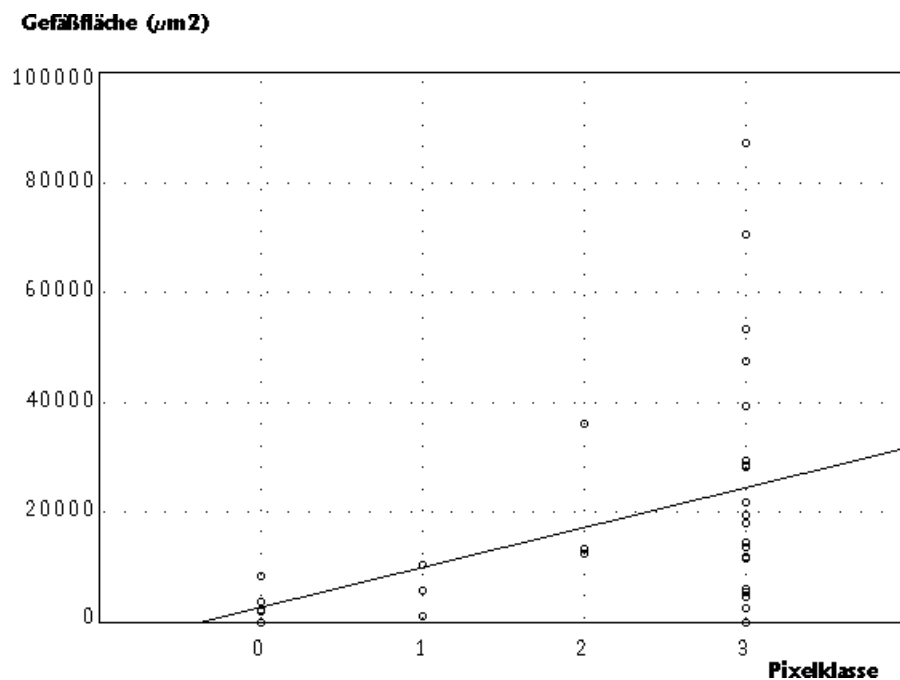


Abbildung 22: Gefäßgesamtfläche und Pixelklasse der Blutgefäße mit einem Durchmesser > 100 µm und mit einem Durchmesser < 100 µm zusammen

4.3.2 Prognose und Tumervaskularisation

Für den Zusammenhang zwischen den Vaskularisationsparametern und der Tumorgroße sind zwischen diesen die Produktmomentkorrelationskoeffizienten berechnet worden (Tabelle 29). 30 der 34 Mammakarzinome befanden sich im Stadium pT1 oder pT2. Es bestand kein enger Zusammenhang zwischen den Vaskularisationsparametern und der Tumorgroße, so daß auf eine Stratifikation in die verschiedenen Tumorgroßen verzichtet werden konnte.

Tabelle 29: Korrelation der Vaskularisationsparameter mit der Tumorgroße

Vaskularisationsparameter	Produktmomentkorrelationskoeffizient nach Pearson
Gefäßanzahl	
> 100 µm	0,31
< 100 µm	-0,13
Gefäßwanddicke	
> 100 µm	0,07
< 100 µm	0,25
Lumenfläche	
> 100 µm	0,07
> 100 µm	0,17
Gesamtgefäßfläche	0,32

4.3.2.1 Lymphknotenmetastasierung und Anzahl der Blutgefäße im Mammakarzinom

Zwischen den Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen (pN1) und denen ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der morphometrisch bestimmten mittleren Gefäßzahlen der Gefäße mit einem Durchmesser von $> 100 \mu\text{m}$ und den Gefäßen mit einem Durchmesser von $< 100\mu\text{m}$ erkannt werden (Tabellen 30 und 31).

4.3.2.2 Lymphknotenmetastasierung und Gefäßflächen im Mammakarzinom

Bei den großlumigen Tumorgefäßen mit einem Durchmesser $> 100 \mu\text{m}$ gab es bei der mittleren inneren Gefäßfläche und bei der mittleren Gesamtgefäßfläche signifikante Unterschiede zwischen den Patientinnen mit pN1 und denen mit pN0. Diese Gefäßflächen waren bei den Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen signifikant größer als bei denen ohne Lymphknotenmetastasen ($p < 0,02$, Tabellen 30 und 31).

Zwischen den lymphknotenpositiven und den lymphknotennegativen Patientinnen bestanden signifikante Unterschiede innerhalb der kleinlumigen Tumorgefäße mit einem Durchmesser $< 100 \mu\text{m}$ in bezug auf derer inneren Gefäßfläche. Diese Fläche war bei den Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen signifikant größer als mit den pN0-Patientinnen ($p < 0,04$, Tabellen 29 und 30). Wenn die Gesamtgefäßflächen der kleinen und großen Tumorgefäße zusammen gezählt wurden, gab es einen signifikanten ($p < 0,03$) Unterschied zwischen den Mammakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen und denen ohne. Die Gesamtgefäßfläche der pN0-Karzinome betrug: $30.565,8 \mu\text{m}^2$, die der pN1-Karzinome $49.879,0 \mu\text{m}^2$.

Tabelle 30: Mittelwerte und Streuung der histomorphologischen Parameter der Tumor-gefäße mit einem Durchmesser $> 100 \mu\text{m}$ und Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN1)

	pN0	pN1	Signifikanz (t-Test)
Anzahl der Patienten	14	20	
Anzahl der Tumorgefäße (Anzahl pro mm^2)	$2,4 \pm 3,6$ (0,9)	$4,1 \pm 3,39$ (1,5)	n.s.
Gefäßwanddicke (μm)	$12,14 \pm 13,2$	$13,0 \pm 9,4$	n.s.
Innere Gefäßfläche (μm^2)	$315,64 \pm 220,47$	$585,33 \pm 333,58$	0,013
Gesamtgefäßfläche (μm^2)	$10.943,3 \pm 12.843,1$	$25.284,1 \pm 23.804,5$	0,03

Tabelle 31: Mittelwerte und Streuung der histomorphologischen Parameter der Tumorgefäße mit einem Durchmesser < 100 µm und Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN1)

	pN0	pN1	Signifikanz (t-Test)
Anzahl der Patienten	14	20	
Anzahl der Tumorgefäße (Anzahl pro mm ²)	103,6 ± 50,1 (38,4)	95,8 ± 31,6 (35,5)	n.s.
Gefäßwanddicke (µm)	3,11 ± 1,2	2,97 ± 1,4	n.s.
Innere Gefäßfläche (µm ²)	168,6 ± 80	276,8 ± 167,6	0,018
Gesamtgefäßfläche (µm ²)	19.622,6 ± 21.724,1	24.594,9 ± 12.358,6	n.s.

4.3.3 Therapiemonitoring und Tumorvaskularisation

- Die histologischen Regressionsgrade nach Sinn et al. (82) der Mammakarzinome nach präoperativer Chemotherapie waren:
Grad 0: 7 Patientinnen,
Grad 1: 9 Patientinnen,
Grad 2-4: 3 Patientinnen.

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Östrogenrezeptorexpression unter der präoperativen Chemotherapie geändert hat. Die 15 Patientinnen mit nachgewiesenen Östrogenrezeptoren blieben Rezeptor-positiv, die 4 Patientinnen ohne Östrogenrezeptornachweis blieben Rezeptor-negativ. Die Progesteronrezeptoren verhielten sich ähnlich, bei 14 Patientinnen wurden vor der Therapie Rezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen, nach der Therapie bei 15 Patientinnen, vor Therapie waren 5 Patientinnen Progesteronrezeptor-negativ, nach der Therapie 4 Patientinnen. Die Mittelwerte der einzelnen Vaskularisationsparameter wurden vor und nach der Chemotherapie auf signifikante Unterschiede innerhalb der gesamten Patientinnengruppe untersucht (Tabelle 31). Zusätzlich wurde der Einfluß der histologischen Regressionsgrade auf die Veränderung der Vaskularisationsparameter untersucht (Tabelle 32 und 33).

Tabelle 32: Vergleich der Tumorvaskularisation vor- und nach präoperativer Chemotherapie (Mittelwerte und Standardabweichung der gemessenen Merkmale).

Merkmal	Vor primärer Chemotherapie	Nach primärer Chemotherapie	t-Test
Anzahl der Patientinnen	19	19	
Anzahl der Tumorgefäße pro mm ²	25,62 ± 13,3	22,44 ± 6,92	0,36
Gefäßwanddicke (µm)	3,4 ± 4,1	3,36 ± 3,1	0,86
Innere Gefäßfläche (µm ²)	161,16 ± 67,97	154,76 ± 76,6	0,79
Gesamtgefäßfläche (µm ²)	318,9 ± 136,3	273,79 ± 98,7	0,25
Gefäßinnenlänge (µm)	47,16 ± 10,9	44,33 ± 10,8	0,42
Gefäßaußenlänge (µm)	72,56 ± 17,42	64,27 ± 14,37	0,12

4.3.3.1 Anzahl der Gefäße vor und nach der Chemotherapie

Die mittlere Anzahl der Tumorgefäße pro mm² mit einem Durchmesser von unter 100 µm betrug vor der präoperativen Chemotherapie 25,6 und nach der Therapie 22,4 und änderte sich damit nicht signifikant (p=0,36, Tabelle 31).

Auch bei histologisch nachgewiesener Regression (Regressionsgrad 1-4) änderte sich die mittlere Gefäßanzahl nicht signifikant (vorher: 24,6; nachher 23,8; p=0,9, Tabelle 32).

4.3.3.2 Mittlere Gefäßwanddicke (in µm) vor und nach der Chemotherapie

Die mittlere Breite der Gefäßwand änderte sich nicht signifikant (p=0,86) vor (3,4 µm) und nach der Chemotherapie (3,36 µm) in der Gruppe aller 19 Patientinnen (Tabelle 31).

Die histologische Regression hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Gefäßwanddicke unter der Chemotherapie (Tabellen 32 und 33 und Abbildungen 32 und 33):

- Regressionsgrad 0: vor der Therapie: 3,3 µm; nach der Therapie: 3,5 µm (p=0,65)
Regressionsgrad 1-4: vor der Therapie: 3,6 µm; nach der Therapie: 3,2 µm (p=0,31)

4.3.3.3 Mittlere Gefäßinnenfläche (Lumenfläche, in µm²) vor und nach der Chemotherapie

Die mittlere innere Lumenfläche änderte sich in der gesamten Patientinnengruppe nicht signifikant (p=0,79) unter der präoperativen Chemotherapie (vorher: 161,2 µm²; nachher: 154,8 µm², Tabelle 31).

Die histologische Regression hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Gefäßlumenfläche unter der Chemotherapie (Tabellen 33 und 34 und Abbildungen 23 und 24):

- Regressionsgrad 0: vor der Therapie: 152,1 µm²; nach der Therapie: 184,5 µm² (p=0,48)
Regressionsgrad 1-4: vor der Therapie: 157,6 µm²; nach der Therapie: 120,2 µm² (p=0,22)

4.3.3.4 Mittlere Gesamtgefäßfläche (in μm^2) vor und nach der Chemotherapie

Die mittlere Gesamtgefäßfläche veränderte sich nicht signifikant ($p=0,25$) unter der Chemotherapie (vorher: $318,9 \text{ mm}^2$; nachher: $273,8 \text{ mm}^2$, Tabelle 31). Auch der Regressionsgrad hatte keinen Einfluß ($p=0,75$ bei Regressionsgrad 0 und $p=0,12$ bei den Regressionsgraden 1-4, Tabelle 32 und 33 und Abbildungen 32 und 33).

Tabelle 33: Vergleich der Tumervaskularisation vor- und nach präoperativer Chemotherapie (Mittelwerte und Standardabweichung der gemessenen Merkmale) in Abhängigkeit vom Regressionsgrad.

Merkmal Regressionsgrad 0I	Vor primärer Chemotherapie	Nach primärer Chemotherapie	t- Test
Anzahl der Patientinnen	7	7	
Anzahl der Tumorgefäße /mm ²	$28,69 \pm 16,7$	$22,88 \pm 5,55$	0,41
Gefäßwanddicke (μm)	$3,32 \pm 1,1$	$3,55 \pm 0,78$	0,65
Innere Gefäßfläche (μm^2)	$304,73 \pm 109,4$	$324,46 \pm 118,8$	0,75
Gesamtgefäßfläche (μm^2)	$152,12 \pm 70,55$	$184,51 \pm 95,44$	0,48
Gefäßaußenlänge (μm)	$70,23 \pm 17,15$	$70,82 \pm 19,38$	0,95
Gefäßinnenlänge (μm)	$46,66 \pm 10,5$	$47,49 \pm 14,83$	0,91

Merkmal Regressionsgrad 1-4	Vor primärer Chemotherapie	Nach primärer Chemotherapie	t- Test
Anzahl der Patientinnen	12	12	
Anzahl der Tumorgefäße / mm ²	24,56 ± 12,95	23,78 ± 8,5	0,88
Gefäßwanddicke (µm)	3,59 ± 0,7	3,22 ± 0,76	0,31
Innere Gefäßfläche (µm ²)	344,65 ± 171,4	241,06 ± 77,65	0,12
Gesamtgefäßfläche (µm ²)	157,63 ± 73,7	120,22 ± 469,16	0,22
Gefäßaußenlänge (µm)	74,06 ± 19,2	61,25 ± 8,77	0,09
Gefäßinnenlänge (µm)	46,79 ± 11,48	40,8 ± 8,1	0,22

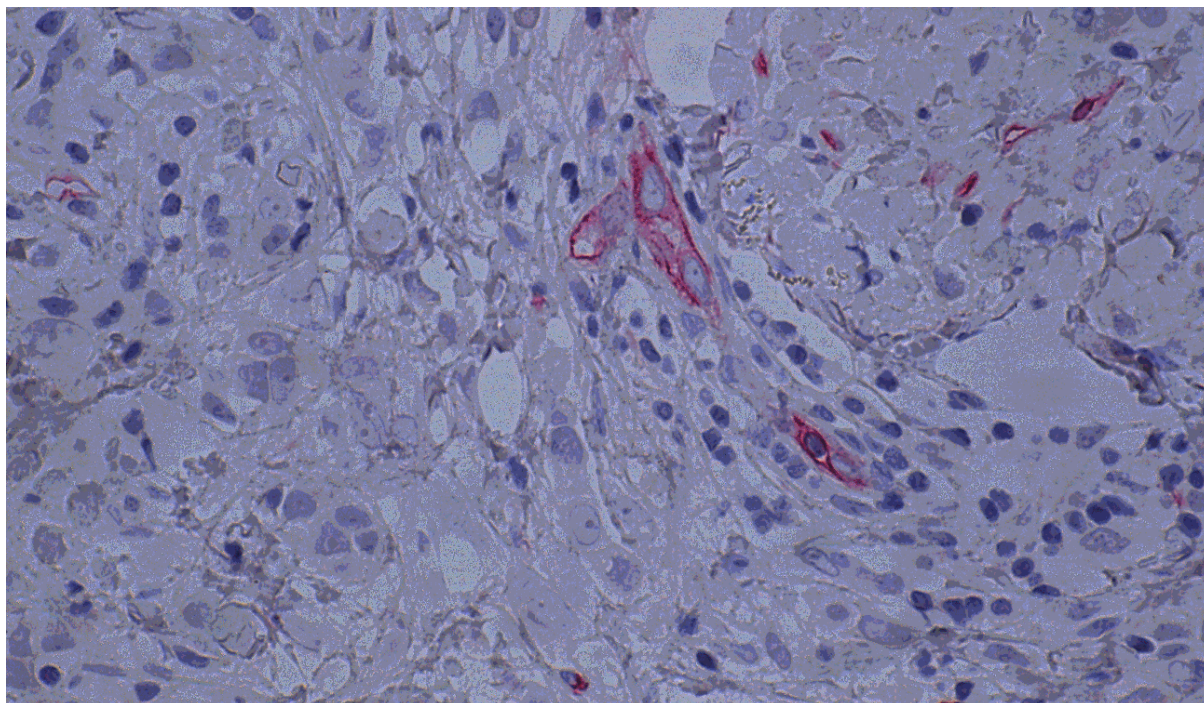


Abbildung 23: Histologisches Bild (HE-Färbung, 400x), CD34-Färbung der Gefäßwände. Invasives duktales Mammakarzinom prämenopausal, T3N1M0G2. Vor der Chemotherapie. Beachte die geringe Anzahl kleinlumiger Tumorgefäße.

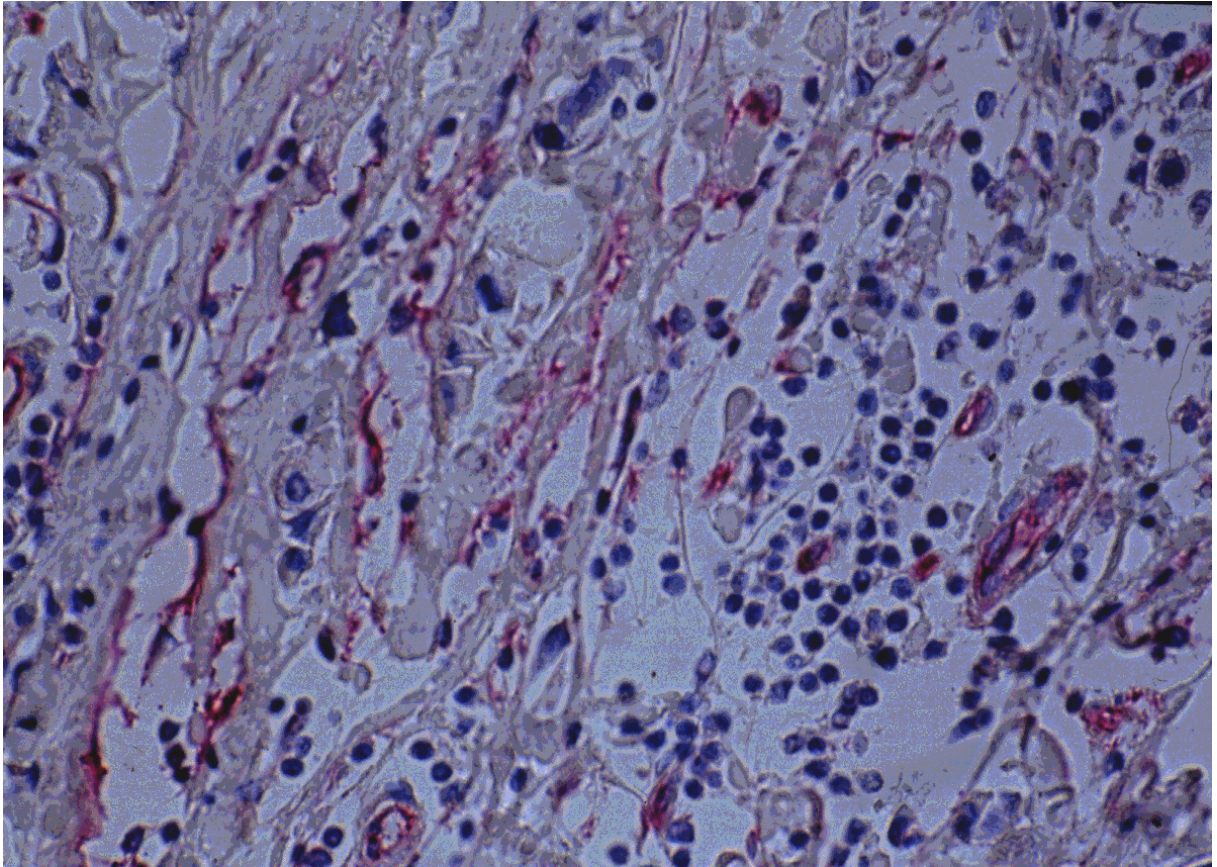


Abbildung 24: Histologisches Bild (HE-Färbung, 400x), CD34-Färbung der Gefäßwände. Mammakarzinom prämenopausal, T3N1M0G2. Nach der Chemotherapie. Stable disease. Regressionsgrad 0. Das Bild zeigt keine Verringerung der Zahl und keine Veränderung der Form der kleinlumigen Tumorgefäße.

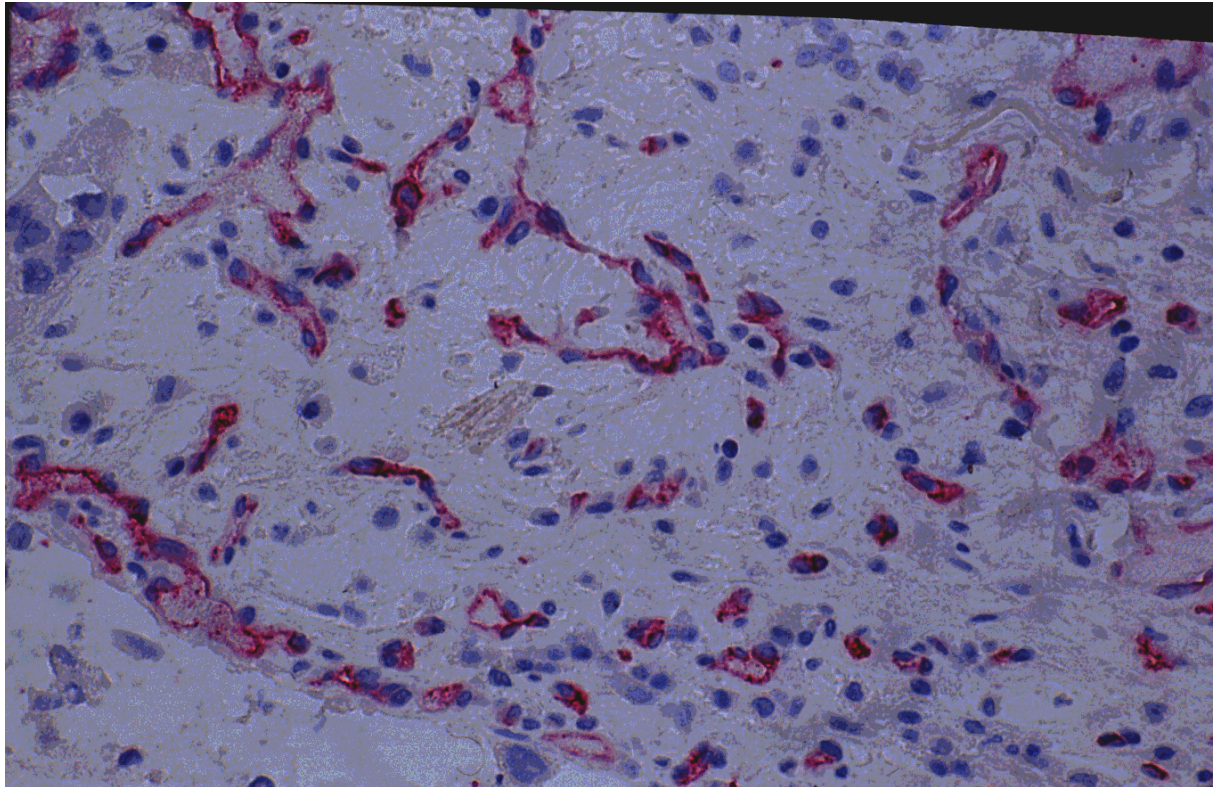


Abbildung 25: Histologisches Bild (HE-Färbung, 400x), CD34-Färbung der Gefäßwände. Mammakarzinom prämenopausal, T3N1M0G2. Vor der Chemotherapie. Beachte die geschlängelte Form der Tumorgefäße

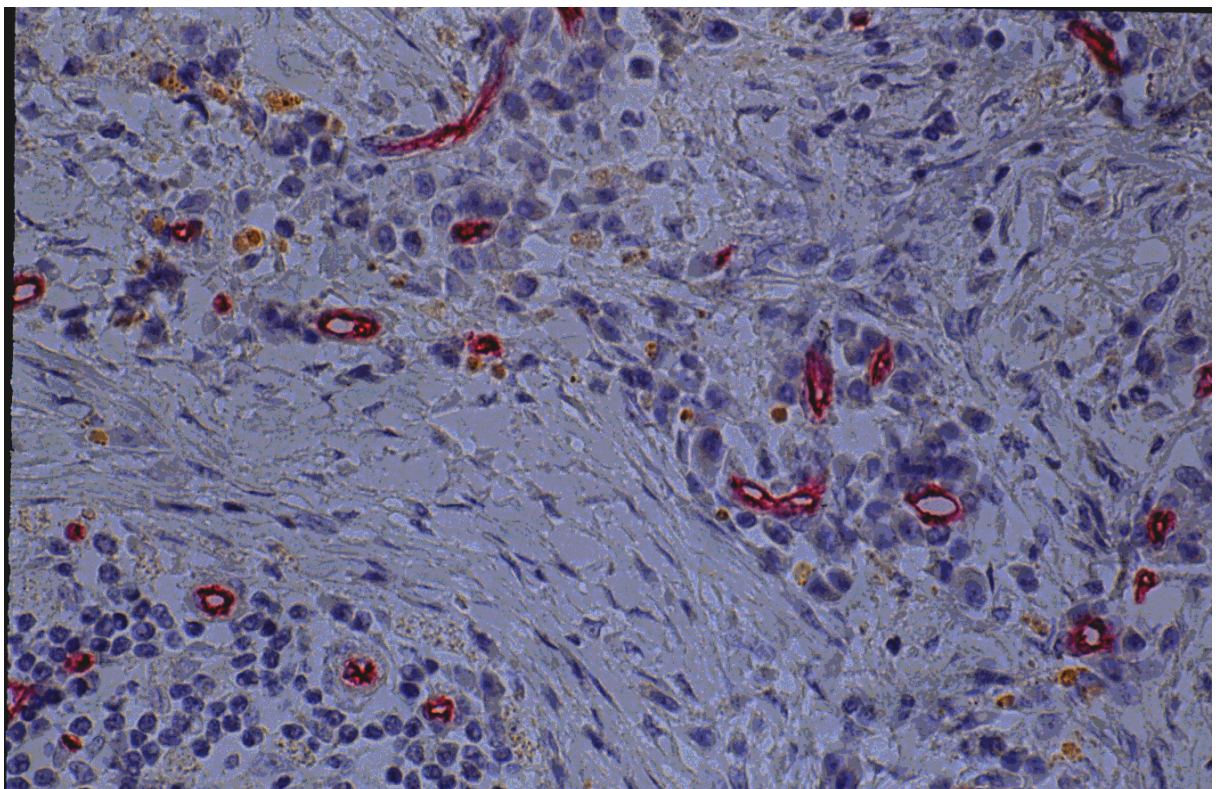


Abbildung 26 Histologisches Bild (HE-Färbung, 400x), CD34-Färbung der Gefäßwände. Mammakarzinom prämenopausal, T3N1M0G2. Nach der Chemotherapie ypT2ypN1M0G2. Partielle Remission. Regressionsgrad 2. Beachte die Zeichen der Regression wie Fibrosierung und die veränderte Form der Gefäße, die sich in der Abnahme des Gefäßumfanges quantifizieren läßt.

4.3.3.5 Mittlerer innerer Umfang der Gefäße (in μm) vor und nach der Chemotherapie

Der mittlere innere Umfang der Gefäße nahm nicht statistisch signifikant ($p=0,42$) unter der Chemotherapie bei allen Patientinnen ab (vorher: $47,2\ \mu\text{m}$, nachher $44,3\ \mu\text{m}$, Tabelle 31). Der Grad der histologische Regression hatte keinen Einfluß auf den innere Umfang der Gefäße unter der Chemotherapie. Bei histologischer Remission (Regressionsgrad 1-4) nahm die Lumenlänge nicht signifikant ab (Tabellen 32 und 33 und Abbildungen 23 und 24):

- Regressionsgrad 0: vor der Therapie: $46,7\ \mu\text{m}$; nach der Therapie: $47,5\ \mu\text{m}$ ($p=0,9$)
Regressionsgrad 1-4: vor der Therapie: $46,8\ \mu\text{m}$; nach der Therapie: $40,8\ \mu\text{m}$ ($p=0,22$).

4.3.3.6 Mittlerer äußerer Umfang der Gefäße (in μm) vor und nach der Chemotherapie

Der mittlere äußere Umfang der Gefäße änderte sich ebenfalls nicht signifikant ($p=0,12$) unter der präoperativen Chemotherapie bei den 19 Patientinnen (vorher: $72,6\ \mu\text{m}$; nachher: $64,3\ \mu\text{m}$). Ein Trend zu einem kleineren Umfang und damit zu einer Formveränderung der Tumorgefäße war erkennbar (Tabelle 31).

Das Ausmaß der histologischen Regression (Regressionsgrad 0 vs. 1-4) beeinflusste die Gefäßaußenlänge unter der Chemotherapie, so daß sie bei histologischer Remission (Regressionsgrad 1-3) **beinahe signifikant** ($p=0,09$) kürzer als vor der Therapie war (Tabellen 32 und 33 und Abbildungen 23 bis 26):

- Regressionsgrad 0: vor der Therapie: $70,2\ \mu\text{m}$; nach der Therapie: $70,8\ \mu\text{m}$ ($p=0,95$)
Regressionsgrad 1-4: vor der Therapie: $74,1\ \mu\text{m}$; nach der Therapie: $61,3\ \mu\text{m}$ ($p=0,09$)

5 Diskussion

5.1 Farbdopplersonographie (CD)

Die Ergebnisse der publizierten Studien zum Einsatz der CD beim Mammakarzinom sind vielfältig und z.T. gegensätzlich. Es wurden hohe Flußgeschwindigkeiten (V_{\max}) und hohe periphere Widerstände (RI) im Mammakarzinom als typisch für das Mammakarzinom beschrieben (84-88) ebenso wie niedrige Flußgeschwindigkeiten und niedrige Gefäßwiderstände (30,89,90).

Eine mögliche Erklärung dieser Resultate ist sicher die im Verlauf von 10 Jahren veränderte Ultraschalltechnik, die es möglich machte, auch langsamere Flüsse zu erkennen. Jedoch gerade die älteren Arbeiten beschrieben die langsamen Flüsse als typisch. Eventuell sind hier tumornahe Parenchymgefäße selektiert worden in der Hoffnung, die Ergebnisse aus der Doppleruntersuchung der Ovarialkarzinome (91,92) beim Mammakarzinom zu übernehmen. Die Zunahme des Gesamtquerschnittes bei der Tumorangio-genese machte dies auch plausibel. Im Gegensatz zum Ovarialkarzinom besteht im Mammakarzinom ein hoher hydrostatischer Druck. Zusätzlich zu den Besonderheiten der Tumorgefäße (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1.) würde dies eher einen hohen Gefäßwiderstand und hohe Flußgeschwindigkeiten (in den arterio-venösen Shunts) erwarten lassen, was auch experimentell gemessen wurde (18,89) und den Ergebnissen der hier vorgelegten Studie entspricht (Mammakarzinome hatten eine signifikant höhere V_{\max} (median 17,6 cm/s) als benigne Herdbefunde (median 13,9 cm/s) und einen signifikant höheren RI (median 0,72) als benigne Herdbefunde (median 0,69).

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse der Studiengruppen liegt sicher auch in der interindividuellen und intraindividuellen Inhomogenität der Vaskularisation und Durchblutung der Mammakarzinome. In einem Mammakarzinom sind also verschiedene Meßergebnisse zu erwarten. Es muß deshalb eine genaue Definition der Auswahl der Tumorgefäße für die vergleichenden Messungen erfolgen, so auch in den in dieser Habilitationsschrift vorgestellten Studien, bei denen die schnellsten Flüsse in jedem Herdbefund und die Ebene mit den meisten pulsierenden Farbpixeln ausgewählt wurden, um Vergleichbares zwischen den Herdbefunden zu vergleichen und die intraindividuelle Inhomogenität der Meßergebnisse zu reduzieren.

Die Messung von Absolutwerten aus der Dopplerhüllkurve (maximale systolische und minimale enddiastolische Geschwindigkeit) war bei hohen Geschwindigkeiten im Vergleich mit der Analyse von Flußkurven mit kleinen Geschwindigkeiten präziser. Würde man die Summe aller Flußkurven bilden, wie Madjar et al. (93,94) dies getan haben, könnten durch die Möglichkeit der Mehrfachmessung eines Flusses in einer anderen Tumorebene methodische Fehler auftreten. Wenn die Anzahl der auszuwertenden Parameter wie die der ableitbaren Flüsse von Patientin zu Patientin jedoch variiert, ist ein statistischer Vergleich der Durchblutung mit Hilfe der Dopplerflußkurve nicht möglich.

Die interindividuellen Unterschiede der Durchblutung des Mammakarzinoms können auch an der großen Streuung der hier vorgestellten Ergebnisse erkannt werden (Tabellen 12 und 13). Trotzdem sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zur **Differentialdiagnose mit der CD** valide, denn signifikante Unterschiede zwischen benignen und malignen Herdbefunden der gewählten Parameter V_{\max} und RI wurden bei der Durchblutung in den Herdbefunden, nicht bei der Durchblutung in der gesunden, kontralateralen Brust nachgewiesen. So sind signifikante Unterschiede zwischen den malignen und benignen Herdbefunden mit den meßbaren Parametern der Tumordurchblutung zu erkennen, die Hypothese dieser Studie kann also angenommen werden.

Die große Streuung der Meßergebnisse und die komplizierte und zeitaufwendige Methodik machen die konventionelle Farbdopplersonographie jedoch wenig geeignet für die Differentialdiagnose in der täglichen Praxis. Die relativ niedrige Spezifität (75%) und der niedrige positive Vorhersagewert (72%) im Vergleich zur Mammographie (77% und 79%) und Mammasonographie (80% und 81%) unterstreichen diese kritische Wertung der CD in der Differentialdiagnostik. Sie ist nicht besser als die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungsmethoden in der Mammadiagnostik. Schelling et al. (95) haben ebenfalls mit der CD eine geringere Sensitivität (85%) und Spezifität (79%) als mit der B-Bild-Sonographie (88 bzw. 96%) erreicht, aber durch die Kombination beider Verfahren eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 96% erreicht, allerdings bei einer präoperativen Untersuchung ausschließlich palpabler Mammatumoren. Sie haben einen einfachen Entscheidungsbaum aus beiden Methoden entwickelt und können durch die Kombination von palpablem Tumor, breitem Randsaum des sonographischen Herdbefundes und einer nachweisbaren Durchblutung mittels der logistischen Regression (siehe Abschnitt 1.2.1.) eine diagnostische Sicherheit von 100% für ein palpables Mammakarzinom erreichen.

Delorme et al. (96) haben ebenfalls mit der Methode der Bestimmung der V_{\max} nur eine Sensitivität von 55% und eine Spezifität von 45% erreichen können. Sie haben zudem nach systematischen Farbdoppler-Untersuchungen an der Schilddrüse Schwankungen in der Bestimmung der

Flußgeschwindigkeit von 20-30% zwischen den Untersuchern festgestellt (allerdings nur eine grenzwertig signifikante Untersucherabhängigkeit, da in die Ergebnisse auch Inhomogenitäten der Durchblutung und interindividuelle Schwankungen eingehen, $p=0,05$ im t-Test der Paardifferenzen). Folgerichtig muß nach Methoden der Messung der Tumordurchblutung gesucht werden, die in der Differentialdiagnostik diese Nachteile nicht aufweisen. Es müssen Merkmale gemessen werden, die leicht reproduzierbar und objektiv zu erheben sind (97). Cosgrove und Eckersley (97) haben mit ihrem Artikel „Doppler indices in tumors – resolution of a dilemma?“ auf die biologischen (inhomogene Tumordurchblutung), technischen (Selektion der schnellen Flüsse, da sie leichter erkannt werden und reproduzierbarer gemessen werden, siehe Abschnitt 3.1.1 zur Methodik der Spektraldoppleruntersuchung), praktischen (lang dauernde Untersuchung) Probleme hingewiesen und damit die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Techniken zur gleichzeitigen Darstellung der Durchblutung im gesamten Tumor begründet.

Bis die bis heute experimentellen Entwicklungen in der Praxis verfügbar sein werden, muß nach anderen diagnostischen Wegen gesucht werden. Reproduzierbar (61) und einfach zu erheben und heute schon verfügbar ist die Einteilung der pulsierenden Farbpixel in Pixelklassen. Mit dieser Methode wurde auch in dieser Untersuchung ein hoch signifikanter Unterschied ($p<0,0002$) zwischen malignen und benignen Herdbefunden erkannt. Trotzdem gelang es nicht, bessere Ergebnisse als mit der hochauflösenden Mammasonographie im direkten Vergleich (multivariate Diskriminanzanalyse (39)) zu erreichen. Delorme et al. (96) haben mit der automatisierten Analyse verschiedener Merkmale der Farbpixel der CD eine Spezifität von mindestens 90% und einen positiven Vorhersagewert von 80% erreichen können. In der Differentialdiagnose wird zunehmend die „Morphologie der Tumovaskularisation“ im CD-Modus zur Differenzierung der sonographischen Herdbefunde genutzt (98). Bei Betrachtung der zur Illustration dieses „malignen Typs“ publizierten Abbildungen kann dieser auch der semiquantitativen Pixelklasse III und der „benigne“ Typ der Pixelklasse II zugeordnet werden. Dadurch würden sprachliche und fachliche Ungenauigkeiten und willkürliche und unkorrekte Bezeichnungen wie: Durchblutung anstelle von Vaskularisation, Tumor anstelle von Herdbefund, „Morphologie“ anstelle von Bildgebung, „penetrieren“ anstelle von Überlagerung usw. vermieden. Ein anderer Weg mit den Ergebnissen der CD in der Differentialdiagnostik umzugehen, ist diese Technik in einer anderen Indikation, hier in der präoperativen Abschätzung der Prognose mit der CD einzusetzen.

Sohn et al. (31) benutzten ein neues, vom konventionellen Farbdoppler abweichendes, sonographisches Verfahren zur farbigen Darstellung langsamer Blutflüsse in Mammatumoren, die Maximum Entropy Method-Technology (MEM, Acoustic Imaging, Phoenix Arizona, USA). Damit gelang es ihnen, mit einer semiquantitativen Einteilung der Farbpixel statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen einzelnen Prognosefaktoren (TNM, Ploidie, S-Phasen-Fraktion, Hormonrezeptorstatus) und diesen Pixelklassen darzustellen. In dieser Untersuchung wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Eingruppierung in diese Gruppen zwischen verschiedenen Untersuchern festgestellt. Diese Klasseneinteilung ist somit reproduzierbar und objektiv.

Seit 1995 sind einige Publikationen zur präoperativen Einschätzung der Prognose von Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit Hilfe der Farbdopplersonographie erschienen (60-62,79,80). Nach Lee et al. (60) soll bei T1-Mammakarzinomen eine hohe systolische Maximalgeschwindigkeit mit der Lymphknotenmetastasierung assoziiert sein, nicht jedoch bei den größeren Mammakarzinomen. In der hier vorgelegten Untersuchung nahmen die medianen Geschwindigkeiten mit steigender Tumorgroße zu, waren aber nicht signifikant höher bei größeren Tumorstadien. Die Anzahl der pulsierenden Farbpixel nahm mit steigender Tumorgroße in der hier vorgestellten Untersuchung schwach signifikant zu ($p=0,048$).

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen hohen Flußgeschwindigkeiten und einer Lymphknotenmetastasierung konnte in der hier vorgestellten Habilitationsschrift (Abschnitt 4.1.2) ebenfalls festgestellt werden. Auch die semiquantitative Einschätzung der pulsierenden Farbpixel im sonographischen Herdbefund in Pixelklassen läßt Schlüsse auf die Lymphknotenmetastasierung zu. So wurden bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen signifikant häufiger pulsierende Farbpixelflächen (Klasse II und III in 95%, $p=0,008$) registriert als bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen. Die Unterteilung zwischen nicht erkennbarem und erkennbarem Fluß wäre in der hier vorgestellten Untersuchung für die präoperative Aussage zur Lymphknotenmetastasierung methodisch ausreichend gewesen. In der Studie von Sohn et al. (61) hatten 91% der Patientinnen, deren Blutfluß im Mammakarzinom in die Klasse I eingeordnet wurde, keine Lymphknotenmetastasen, im Gegensatz zu denen mit der Pixelklasse III, die dann zu 81% lymphknotenpositiv waren. In dieser vorgelegten Studie innerhalb der Habilitationsschrift hatten von den Patientinnen mit der Pixelklasse I 82% keine Lymphknotenmetastasen. In der Patientengruppe mit der Pixelklasse III hatten hingegen 63% metastatisch befallene Lymphknoten. Die Untersuchung von Sterns et al. (62) kommt zu ähnlichen Ergebnissen. Der Nachweis von Blutfluß mit der CD im Herdbefund war häufiger bei Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen und späterem Rezidiv,

wenngleich nicht statistisch signifikant. Allerdings konnten sie nur bei 25% aller 207 untersuchten Patientinnen mit einem invasiven duktalem Mammakarzinom Blutfluß im sonographischen Herdbefund mit der von ihnen eingesetzten Technologie nachweisen.

In der hier vorgestellten Studie waren die medianen maximalen systolischen und minimalen enddiastolischen Geschwindigkeiten der mit der CD darstellbaren Blutflüsse in den gering differenzierten Karzinomen signifikant höher als bei den gut differenzierten.

Somit konnte auch in dieser Untersuchung die Hypothese angenommen werden, daß mit den Parametern der CD in vivo auf einige histomorphologische Ergebnisse (pN, G) geschlossen werden kann.

Das bedeutet jedoch nicht, daß auf die histomorphologische Untersuchung des Mammakarzinoms und der axillären Lymphknoten verzichtet werden kann, da bisher alle adjuvanten Therapien von den histologischen Ergebnissen des Mammatumors und der axillären Lymphknoten und dem Alter der Patientin abhängig gemacht wurden. Die Reduktion der Mortalität am Mammakarzinom trotz steigender Inzidenz wurde neben der verbesserten Früherkennung durch den Einsatz der adjuvanten Therapie nach diesen etablierten Kriterien erreicht (99). Erst nach einer Prüfung des Einsatzes neuer Prognoseparameter innerhalb randomisierter Studien im Vergleich mit den bisherigen Methoden und dem Nachweis der Überlegenheit dieser neuen Parameter, dürfen diese in der klinischen Praxis eingesetzt werden. Bisher sind nur der Gehalt der Tumorproteasen (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA)) und deren spezifischen Inhibitoren (Plasminogenaktivator-Inhibitor 1, PAI-1) im Tumorgewebe in einer prospektiven Studie als unabhängige Prognosefaktoren nach einem multivariaten Vergleich bei nodalnegativen Mammakarzinomen nachgewiesen worden (52).

Zunächst wurde in der Untersuchung zum Vergleich der Farbdopplersonographie mit der Magnetresonanztomographie (MRT) bestätigt, daß die Kontrastmittel-MRT besser in der Lage war, zwischen benignen und malignen Herdbefunden der Mamma zu unterscheiden (39,103-105). Mit der CD konnte dies beim Parameter V_{max} in dieser Studie nicht und bei anderen Studien nur bei ausreichend hoher untersuchter Patientinnenzahl nachgewiesen werden (39,85,94,106). Die MRT ist offensichtlich besser in der Lage, die spezifische Durchblutung des Mammakarzinoms (Hypervaskularisation, erhöhte Gefäßpermeabilität) darzustellen als die Dopplersonographie.

Beim Vergleich der relativen Zunahme der Signalintensität im MRT nach Injektion des Kontrastmittels Gd-DTPA mit der V_{max} des CD fällt auf, daß es eine enge Korrelation zwischen beiden Methoden bei den untersuchten benignen Herdbefunden der Mamma gibt, nicht aber bei den malignen Herdbefunden. Eine schnelle Anreicherung und hohe Signalintensität nach Kontrastmittelgabe bei der MRT stand im Zusammenhang mit einer hohen systolischen maximalen Geschwindigkeit, gemessen mit der CD in Gefäßen benigner Herdbefunde. Die relative Signalintensitätserhöhung im MRT korrelierte nur mit der maximalen systolischen Geschwindigkeit zu den Zeitpunkten 2-5, also zum Zeitpunkt des Plateaus, nicht zum Zeitpunkt 1, also der Zeit des Anstiegs der Signalintensität. Eine mögliche Erklärung ist, daß es bei malignen Herdbefunden aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität der Tumorgefäße zu einem Austritt des MRT-Kontrastmittels Gd-DTPA aus den Gefäßen kommt. Es charakterisiert also nicht nur die intravasale Kontrastmittelkinetik, sondern bei den malignen Herdbefunden auch die Kinetik des extravasalen Kontrastmittels (33,34). In benignen Herdbefunden verbleibt das Gd-DTPA in den Gefäßen. Hier korreliert die intravasale Kontrastmitteldynamik mit der intravasal gemessenen V_{max} .

Die insbesondere für das Mammakarzinom bekannte Heterogenität der Durchblutung (107) erschwert sicher auch den direkten Vergleich verschiedener Methoden zu dessen Charakterisierung. Die Hypothese, daß die Ergebnisse von MRT und CD miteinander in Korrelation stehen, kann für die benignen Herdbefunde angenommen werden. Für die malignen Herdbefunde muß die Hypothese abgelehnt werden, da beide Methoden unterschiedliche Merkmale der Blutperfusion (vermehrte Durchblutung und schneller Fluß in den arteriovenösen Shunts versus gesteigerte Gefäßpermeabilität und vermehrte Durchblutung) innerhalb der Tumorgefäße (siehe Abschnitt 1.1.) charakterisieren. Grüner et al. (108) haben bei 24 Patientinnen den Zusammenhang zwischen dem relativen Signalintensitätsanstieg (in %) zwischen der 1. und 5. Minute nach Gd-DTPA-Gabe beim MRT und der Anflutungszeit des Ultraschallkontrastmittels Levovist® (in Sekunden), gemessen durch die Beobachtung des Beginns des Kontrastmitteleffektes auf die CD, untersucht. Sie stellten eine schwache ($r=0,47$), aber signifikante Korrelation ($p=0,02$) zwischen diesen Parametern der beiden verschiedenen Untersuchungsmethoden fest. Benigne Herdbefunde zeigten im MRT eine geringere Signalverstärkung und eine längere Zeit bis zum Erkennen des Effektes des Ultraschallkontrastmittels als Mammakarzinome.

In der hier vorgelegten Studie wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß sich beide Methoden in der Darstellung der als Fluß sichtbaren Gefäßmorphologie in ca. 60-70% glichen. Mit beiden Methoden gelang es im konkreten Fall z.B. eine randständige Durchblutung oder eine über den gesamten Herdbefund verteilte Durchblutung zu erkennen. Daß eine Differenz in der Kontrastmittelanreicherung zwischen Tumorpherie und dem Tumorzentrum im MRT beobachtet

werden kann, wurde Anfang der 90er Jahre von Feldmann et al. (28) und als ein differentialdiagnostischer Hinweis im MRT von Sherif et al. (34) beschrieben.

In der hier vorgestellten Studie zum Therapiemonitoring mit der Farbdopplersonographie an 16 Patientinnen, die wegen eines lokal fortgeschrittenen oder inflammatorischen Mammakarzinoms eine Chemotherapie mit Ifosfamid und Epirubicin erhalten haben, konnten keine signifikanten Veränderungen der im Referenzgefäß gemessenen maximalen systolischen Geschwindigkeit, des Resistance Index und der Anzahl der pulsierenden Pixelflächen unter der Chemotherapie festgestellt werden. Aus der Änderung der V_{\max} , des RI und der Anzahl der pulsierenden Pixelflächen konnte auch keine Prädiktion des Ansprechens erkannt werden, wobei eine endgültige Aussage durch die geringe Fallzahl und das geringe histologische und klinische Ansprechen (NC: N=3, PR: N=13; histologische Regressionsgrade: 3: N=1, 2: N=0, 1 und 0: N=15) nur bedingt möglich ist.

Die Hypothese, daß sich mit diesen Parametern der CD das Ansprechen des Tumors erkennen und vorhersagen läßt, kann mit dieser Studie also weder belegt noch widerlegt werden. Andere, in dieser Habilitationsschrift außerdem untersuchte Parameter der Durchblutung (Kontrastmittel-Videodensitometrie) und Vaskularisation (CD34-Färbung und AMBA) müssen deshalb gezielt auf diese Fragestellung hin untersucht werden. Kedar et al. (90) konnten bei allen ihrer unter präoperativer Chemotherapie untersuchten 34 Patientinnen Veränderungen in der Durchblutung (in dieser Publikation als vaskularity bezeichnet) feststellen. Außerdem konnten mit der CD mindestens 4 Wochen eher als klinisch oder B-Bild-sonographisch das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie erkannt werden. Sie schlußfolgern daraus, daß mit der CD das Ansprechen erkannt werden und die Methode benutzt werden kann, um das Ansprechen des Tumors auf eine Therapie vorherzusagen. Das mittlere Alter der untersuchten Patientinnen war das gleiche wie in unserer Studie, 53 Jahre. In die Studie wurden ebenfalls Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen oder inflammatorischen Mammakarzinom aufgenommen. Der Anteil der Non-Responder war ebenfalls gering (7/34). Der Untersucher war ebenso „geblindet“ in bezug auf das klinische Ansprechen. Im Unterschied zu unserer Untersuchung wurden die Patientinnen mit heterogenen Chemotherapien (CMF, MMM) oder mit Tamoxifen über verschiedene Zeiträume behandelt. Die Doppler-Frequenz betrug nur 3 MHz im Gegensatz zu unserer Studie mit einer Doppler-Frequenz von 6 MHz, mit der langsamere Flüsse erkannt werden können. Die Geräteeinstellungen und Art der Doppler-Untersuchung waren vergleichbar. Es wurden ebenso die pulsierenden Farbpixel pro Untersuchungsebene gezählt.

Nach Kedar et al. (90) eignet sich die CD für die Beurteilung der Tumolvaskularisation besser als der histologische Schnitt, da in vitro die Tumorgefäße kollabieren und bei in Formalin fixierten Tumoren die Gefäßgröße abnimmt (100). In der Untersuchung von Kedar et al. (90) nahm die Anzahl der pulsierenden Pixel pro Untersuchungsebene signifikant bei Ansprechen der Therapie ab. In unserer Untersuchung nahm die Anzahl der pulsierenden Pixel bei 11 der 16 Patientinnen (alle 11 zeigten klinisch eine PR) unter einer Chemotherapie zu.

Bamber et al. (101) haben mit dem continuous wave Doppler (sensitiv für langsame Flüsse aber nicht selektiv für Tumorgefäße) eine Verringerung im Frequenz-Shift (vergleichbar mit Veränderungen der V_{\max}) unter präoperativer Tamoxifen-Therapie festgestellt. In unserer Studie nahm hingegen die V_{\max} zu. Eine Erklärung wäre die in unserer Studie intensivere Dosis effektiverer Medikamente, die in einem kürzeren Zeitraum gegeben wurden. In dieser Zeit kann es zu einer Abnahme des hydrostatischen Druckes innerhalb des Tumors kommen (18). Der periphere Widerstand nimmt ab, die Flußgeschwindigkeit kann zunehmen, damit nimmt die Zahl der erkennbaren Blutflüsse (pulsierender Farbpixel) zu. Bei einer länger dauernden Therapie kommt es bei histologischer Regression zur Tumorfibrose (82) und damit Zunahme des peripheren Widerstandes und Abnahme der V_{\max} .

In Übereinstimmung mit den beiden zitierten Autorengruppen wird die Notwendigkeit von weniger subjektiven und weniger zeitaufwendigen und automatisierten Untersuchungsmethoden für die Erfassung von Veränderungen der Durchblutung unter der Chemotherapie betont (101,102).

Ultraschall-Kontrastmittelsonographie (Videodensitometrie)

Bei allen Vorteilen hat die Dopplersonographie auch Nachteile, die ihren Einsatz nur begrenzt möglich machten. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, diese Nachteile durch andere diagnostische Methoden auszugleichen. Dies gilt insbesondere für den Nachweis von langsamen Blutflüssen. Doch gerade in der Tumordiagnostik interessieren die sehr langsam durchflossenen Gefäße zur Differenzierung zwischen malignen und benignen Veränderungen, da die Neovaskularisation als typisches Merkmal eines malignen Gewebes kleinste Gefäße ohne eine Muscularis hervorbringt, so daß dort der Blutfluß sehr langsam sein sollte.

Sohn stellte 1995 in einer Studie (31) fest (14 Patientinnen, 8 maligne und 6 benigne Herdbefunde der Mamma), daß sich bei allen malignen Mammatumoren in der konventionellen Farbtechnik und der Angio-Farbe ein Blutfluß darstellen ließ. Mit dem Angio-Mode konnten mehr Gefäße dargestellt werden als mit dem konventionellen Color Doppler (velocity mode). Außerdem konnte die für Tumorgefäße typische anarchische Gefäßarchitektur mit dem CPA dargestellt werden.

Als Geräteeinstellung für die CPA-Untersuchung wurde in dieser Habilitationsschrift die von Rubin et al. (109) empfohlene verwendet und bei den folgenden Studien zur Videodensitometrie beibehalten. Auch die in dieser Habilitationsschrift vorgelegte Studie zum Color Power Angiomode (CPA) im Vergleich zur Farbdopplersonographie (CD) konnte eine bessere Erkennbarkeit des Blutflusses mit dem CPA im Vergleich zur CD nachweisen. Die Empfindlichkeit für die Erkennung von Blutfluß mit dem CPA war also auch in der klinischen Praxis erhöht. Theoretisch wurde dies auch wegen der erhöhten Ultraschallfrequenz von 10 MHz im Vergleich mit den 6 MHz bei der CD angenommen. Diese Beobachtung wurde besonders bei den malignen Herdbefunden gemacht. Hier war der typische anarchische Gefäßverlauf zu erkennen. Die Hypothese dieser Studie, daß der CPA für die Erkennung von Blutflüssen in Mammatumoren sensitiver als die CD ist, wurde damit angenommen. Die CPA konnte nun als Ultraschallmethode zur sensitiven Darstellung des Blutflusses für die Untersuchungen zur Differentialdiagnose mit der Ultraschallkontrastmittel-Videodensitometrie eingesetzt werden.

Weil sich die auf Mikrobläschen basierenden Ultraschallkontrastmittel ausschließlich intravasal verteilen, können Untersuchungen zur intravasalen Durchblutung durchgeführt werden, die nicht durch das Diffusionsverhalten des Kontrastmittels in das umliegende (Tumor-) Gewebe, wie etwa beim MRT-Kontrastmittel Gadolinium-DTPA (33,34), beeinflusst werden. Außerdem scheint als mögliche Real-time-Untersuchung der Ultraschall im CPA-Mode, wiederum im Gegensatz zu der MRT-Untersuchung, eine optimale funktionelle und kinetische Untersuchungsmethode der Transitzeit des Kontrastmittels und anderer zeitlich veränderlicher Parameter zu sein.

Cosgrove (110) untersuchte zunächst den Einsatz der älteren Ultraschall-Methode, des geschwindigkeitskodierte, konventionellen Farbdopplers, für die Messung der Parameter "time to maximum brightness" und die "wash-out time back to baseline" nach Ultraschallkontrastmittelgabe. Blomley (111) war mit der CD ebenfalls in der Lage, mit Computergestützter Analyse die Parameter "peak enhancement" oder "the area under the time-enhancement curve" und "time to peak enhancement" relativ einfach und reproduzierbar zu erheben und in der Differentialdiagnose von Mammatumoren einzusetzen. Mit unserer Studie konnten wir diese Ergebnisse auch beim Einsatz des modernen und sensitiveren CPA bestätigen und die Machbarkeit der Differentialdiagnostik von Mammatumoren mit Hilfe des CPA und der Kontrastmittel-Videodensitometrie nachweisen. Außerdem nahmen wir den von der Erkennung der Baseline nahezu unabhängigen $T_{90\%}$, I in die für die Differentialdiagnose einsetzbaren Parameter zusätzlich auf, außerdem der errechnete Parameter "Zeit und Helligkeitsparameter". Da dieser Parameter und der "wash-in-wash-out-time Parameter" aus mehr als einem Kurvenparameter berechnet werden, sind sie leichter reproduzierbar und objektiv, daß heißt weniger von der Genauigkeit eines Meßparameters abhängig. Es war mit diesen Parametern möglich, signifikante Unterschiede zwischen benignen und malignen Herdbefunden der Mamma zu erkennen. Diese Parameter und ihre cut-off-Werte wurden retrospektiv nach prospektiv erfaßter Messung erarbeitet mit dem Ziel, die besten Parameter mit der höchsten Spezifität (über 90%) für die Erkennung maligner Herdbefunde zu erhalten.

Die Hypothese, daß es gelingt, mit verschiedenen Parametern der Ultraschall-kontrastmittel-Videodensitometrie sicher zwischen benignen und malignen Herdbefunden der Mamma zu unterscheiden, konnte also angenommen werden.

Albrecht et al. (112) erfaßten mit einer ebenfalls Computer-assistierten quantitativen Technik anhand von Zeit-Intensitäts-Kurven an 20 Patientinnen mit Herdbefunden der Mamma verschiedene Parameter zur Differentialdiagnose. Allerdings verwendeten sie ein anderes Ultraschallkontrastmittel und benutzten als Ultraschalltechnologie den konventionellen Farbdoppler. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen erfaßten sie eine statistisch signifikant längere Zeit der Signalintensitätserhöhung und ein multiphasisches Auswaschen des Kontrastmittels, erkennbar an mehrgipfligen Zeit-Intensitäts-Kurven, bei Karzinomen. Das kann am ehesten mit der anderen Kinetik des verwendeten Kontrastmittels Echogen® (längere Persistenz im Gefäßbett, längere Halbwertszeit des Kontrastmittels) erklärt werden. In unserer Studie war es schwierig, genaue Aussagen zum Auswaschen des Kontrastmittels Levovist® aufgrund der Bewegungsartefakte und der relativ kurzen Plasma-Halbwertszeit des Levovists® zu erhalten. Unsere Ergebnisse stimmen allerdings in der guten Beurteilung der Parameter " $T_{90\%}$, I" und " T_{max} ", "wash-in wash-out Parameter" - ein schnelles Anfluten und langsames Auswaschen des Kontrastmittels - mit der Arbeitsgruppe um Albrecht (112) überein.

Huber et al. (49,50) untersuchten in einem anderen Ansatz zur Messung der Kontrastmittelkinetik die Veränderungen der color pixel density (CPD) nach der Injektion von Levovist® bei 31 Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom und 16 Patientinnen mit benignen Herdbefunden der Brust. Die CPD beschreibt die Menge an Farbe im gewählten Bildausschnitt. Huber et al. scannen die Ultraschallbilder von einem Videoband alle 10 Sekunden in der ersten Minute nach der Injektion von Levovist® und alle 20 Sekunden in den nächsten 2 Minuten ein und errechneten aus den Computerdaten die CPD. Leider wurden keine Angaben zur Ultraschalltechnologie und zu den

Geräteeinstellungen gegeben, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Die Zeit bis zur maximalen Helligkeit war bei Huber et al. (49,50) mit 38 Sekunden bei Karzinomen signifikant kürzer (71 Sekunden) als bei benignen. Diese Zeiten sind nach unserer Erfahrungen sehr lang (median T_{\max} : 22,0 Sekunden bei den Mammakarzinomen und 35,0 Sekunden für benigne Herdbefunde). Die Ursache könnte in der geringen Aquisitionsfrequenz (ein Bild alle 10-20 Sekunden gescannt) in der Huber-Studie (49,50) verglichen mit unserer Aquisitionsrate (25 Bilder pro Sekunde) liegen. Stuhmann et al. (98) konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen benignen und malignen Herdbefunden hinsichtlich der subjektiv-visuell am S-VHS-Video gemessenen Anflutungszeit des Kontrastmittels Levovist® erkennen. Sie beobachteten bei malignen Herdbefunden eine mittlere Anflutungszeit von 32 ± 14 Sekunden und bei benignen Herdbefunden von 38 ± 15 Sekunden. Diese Arbeitsgruppe benutzte die gleiche Kontrastmittelkonzentration und Injektionszeit aber führte die Untersuchungen im CD-Modus aus und benutzte keine Densitometrie zur objektiven Erfassung des Kontrastmitteleffektes.

Ein Problem unserer Studie war die Erkennung des Beginns des Kurvenanstiegs und damit die korrekte Messung der Zeit bis zum Maximum der Kontrastmittel-Intensität, T_{\max} . Deshalb wurde die Anflutungszeit über die maximale Helligkeit bestimmt. $T_{90\%, I}$ (I für linken Teil der Kurve, siehe Abbildung 9) entspricht der Zeit bis zum Erreichen von 90% der maximalen Helligkeitsintensität. Die maximale Helligkeitsintensität ist einfach zu bestimmen, damit ist auch $T_{90\%, I}$ leichter reproduzierbar und objektiver als die subjektive Bestimmung des Beginns des Helligkeitsanstiegs. $T_{90\%, I}$ kann die für die Videodensitometrie entwickelte software selbst bestimmen. Die Videodensitometrie erreichte außerdem ein hohes Maß an Selektion mit einer Spezifität von 92%, einer Sensitivität von 64% und einem Signifikanzniveau für die Trennung von malignen von benignen Herdbefunden von $p < 0,005$ für diesen Parameter. $T_{90\%, I}$ konnte ebenso wie der weniger objektive Parameter T_{\max} (Zeit bis zur maximalen Helligkeit) und die berechneten Parameter wie "Zeit-und-Amplituden-Parameter" und "wash-in wash-out time-Parameter" in der vorliegenden Studie mit einer Spezifität von über 90% die ausgewählten Herdbefunde der Mamma differenzieren.

Grüner et al. (108) erreichten eine Spezifität von 78,6% und eine Sensitivität von 85% für die Dopplersonographie mit Levovist®. Sie maßen vor der Kontrastmittelgabe und 5 Minuten nach i.v.-Gabe des Kontrastmittels die Flußgeschwindigkeiten mit dem Spektraldoppler und gaben als cutt-off Level eine SD (Systole-Diastole)-Ratio von 3,5 an und beurteilten die Kontrastmitteleffekte visuell und subjektiv vom S-VHS-Videoaband. Interessant war, daß bei ihrer Studie die Flußgeschwindigkeiten nach Levovist® niedriger waren als vorher, allerdings zu einer Zeit gemessen, die nach der Halbwertszeit des Kontrastmittels lag.

Bei malignen und benignen Herdbefunden konnte in unserer Studie mit der Videodensitometrie eine Zunahme der maximalen Helligkeit (B_{\max}) nach Levovist®-Gabe nachgewiesen werden, obgleich diese nicht signifikant war. Die Zunahme der Helligkeit durch die Gabe von Kontrastmitteln könnte auch indirekt durch die Zunahme der gemessenen maximalen systolischen Geschwindigkeit V_{\max} nachgewiesen werden. Wir haben uns in einer Studie (112) mit diesem Phänomen beschäftigt und es als einen reproduzierbaren, weitestgehend Untersucher- und Technik-unabhängigen Parameter für die Differentialdiagnose von sonographischen Herdbefunden der Mamma inauguriert. Bei Mammakarzinomen stieg die gemessene V_{\max} unter Levovist® signifikant höher an als bei benignen Herdbefunden. Ähnliche Beobachtungen machten auch Mäurer et al. (113), in dem sie einen stärkeren Anstieg der gemessenen V_{\max} nach Levovist bei Lymphknotenmetastasen als bei reaktiven Lymphknoten beobachteten, diesen Parameter allerdings nicht nach seinem Wert für die Differentialdiagnostik untersuchten.

Mit dieser erfolgreich abgeschlossenen Machbarkeits-Studie zur Videodensitometrie bei Mammatumoren und der Erarbeitung von Parametern, die sicher zwischen malignen und benignen Herdbefunden unterscheiden können, wurde es möglich, diese Methode und die erarbeiteten Parameter in anderen Einsatzgebieten einzusetzen. Nachfolgende prospektive Phase-III-Studien müssen heraus finden, ob diese Parameter besser als die etablierten wie Mammographie und Mammasonographie in der Differentialdiagnose von Herdbefunden der Mamma sind. Kann durch ihren Einsatz auf unnötige Operationen verzichtet werden?

Folgerichtig und entsprechend der Konzeption dieser Habilitationsschrift erfolgte zunächst der Einsatz der Videodensitometrie im Monitoring des Effektes einer präoperativen Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Mammakarzinomen.

Ein Vorteil der präoperativen Chemotherapie ist, daß sich ihre Wirksamkeit auf den Tumor der individuellen Patientin nachweisen läßt. Mit zunehmendem Einsatz noch wirksamerer Medikamente wie den Taxanen mit einer hohen Toxizität trotz der Verbesserung von toxischen Medikamentenkombinationen, wie durch den Einsatz des 4' Epimer vom Doxorubicin, dem Epirubicin (114), wird es zunehmend wichtiger, individuell wirksame Medikamente einzusetzen und deren Toxizität in Kauf zu nehmen und den Einsatz nicht wirksamer Medikamente mit dann nicht

akzeptablen Nebenwirkungen bei Patientinnen zu vermeiden. Zur schnellen Erkennung der individuellen Wirksamkeit von Medikamenten werden bildgebende Verfahren eingesetzt. Die älteste und am weitesten verbreitete Methode dazu ist die klinische Untersuchung, bei den Mammakarzinomen die Palpation und Ausmessung des Tumordurchmessers in 2 Ebenen. Außerdem werden die Konsistenzänderung und der Rückgang der Hautfärbung z.B. beim inflammatorischen Karzinom registriert (74). Diese Einschätzung der Tumorgöße ist unsicher und subjektiv, damit also kaum reproduzierbar und unter verschiedenen Untersuchern vergleichbar.

Bei nicht behandelten Patientinnen erlaubt die Mammographie durch den Dichteunterschied zwischen Tumor und Drüsengewebe eine sichere Beurteilung der Tumorausdehnung einschließlich der intraduktalen Ausläufer durch die Beachtung des suspekt gruppierten Mikrokalkes. Da es unter der Chemo- oder Hormontherapie zu einer Dichteabnahme des Karzinoms kommen kann, ist die Beurteilbarkeit mit der Mammographie deutlich eingeschränkt (115).

Eine im Vergleich zur Palpation wesentlich genauere Methode zur Abschätzung des histologisch beobachteten Ansprechens ist der Ultraschall. Diese Aussage aus einer Phase II-Multizenterstudie (44 Patientinnen) zur präoperativen Chemotherapie (4 Zyklen mit Doxorubicin 50 mg/m² und Docetaxel 75 mg/m² im Abstand von 14 Tagen, unterstützt von Wachstumsfaktoren) in Deutschland (GEPARDO) wurde 1999 erstmalig publiziert und durch vergleichende Untersuchungen der Methoden belegt (73).

Die sonographische Größenmessung stimmt mit der histologischen weitgehend überein (73), obwohl auch mit dieser Methode die Abnahme der Echogenität des malignen Herdbefundes und eine Verwaschung des Randsaumes beobachtet werden (74).

Die Magnetresonanztomographie eignet sich nach Ansicht vieler Untersucher (74,77,116) sehr gut zur Größen- und Volumenbeurteilung des Tumors unter Chemotherapie. In der Magnetresonanztomographie kommt es durch die Chemotherapie zur Verkleinerung der Gd-DTPA-anreichernden Struktur und zur Veränderung (bis zum Angleich an die Kinetik des asymptomatischen Drüsengewebes) der Kontrastmittelkinetik. Bei einer kompletten und partiellen Remission unter der Therapie ändern sich die Größe und die Kontrastmittelkinetik, bei einer stable disease oder einem Tumorprogress bleiben beide unverändert (117).

Mit der ³¹P Magnetspektroskopie als nichtinvasive Methode können Informationen über den Phospholipidmetabolismus, die Zellenergetik und den intrazellulären pH-Wert gewonnen werden. Das Vorhandensein von erhöhten Konzentrationen an Phosphomonoestern in Mammakarzinomen konnte in verschiedenen in vitro- und in vivo-Untersuchungen nachgewiesen werden (118). Die wichtigsten Phosphomonoester (PME) im menschlichen Mammakarzinom, wie auch in anderen Tumoren sind das Phosphorylcholin (PC) und das Phosphorylethanolamin (PE); diese gelten als die Vorläufermoleküle der Phospholipidbiosynthese, so daß der Phosphomonoesterspiegel als Parameter für das Tumorzellwachstum genutzt werden kann. Für die Verlaufskontrolle der präoperativen Therapie des Mammakarzinoms könnte dies von Bedeutung sein, da dann die Möglichkeit bestünde, mit Hilfe der Magnetresonanzspektroskopie ein Absterben der Karzinomzellen vor einem bildmorphologischen Nachweis des Ansprechens der Chemotherapie zu belegen. Aus einem Teil publizierter Studien (119) geht hervor, daß ein Anstieg der PME mit einer Tumorprogression und ein Abfall mit einem Ansprechen des Tumors auf die Therapie korrelieren.

Die Veränderung in Größe, Volumen, Kontrastmittelkinetik (77,116) und Veränderung des ³¹P-Spektrums können zum Monitoring dieser Therapie benutzt werden. Diese verschiedenen Untersuchungen können an einem Gerät ohne Umlagerung erfolgen.

Eine weitere Methode zum Monitoring der Chemotherapie ist die nuklearmedizinische Positronen-Emissions-Tomographie (PET (120)).

Es zeigte sich in dieser ersten Beschreibung des Einsatzes der Videodensitometrie im Therapiemonitoring, daß es möglich sein kann, Unterschiede in der Durchblutung zwischen einer partiellen/kompletten Remission und einem Nicht-Ansprechen auf die Chemotherapie zu erkennen. Bei den von uns untersuchten Patientinnen nahm die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Signalintensität (T_{max} , $T_{90\%,i}$) bei einer klinischen Remission bei den meisten Patientinnen zu und die damit verbundenen „Zeit-und-Amplituden-Parameter“ und „wash-in-wash-out-Parameter“. Die Werte der Densitometrie glichen dann denen benigner Herdbefunde der Brust. Bei keiner Patientin, die eine PR oder CR unter der präoperativen Chemotherapie zeigte, wurde eine Abnahme dieser Werte beobachtet. In dieser Studie wurden die gleichen Patientinnen mit der MRT im Verlauf der Chemotherapie untersucht. Die relative Signalintensität nach Kontrastmittelgabe nahm bei den Patientinnen mit einer PR oder CR ab. Sie stieg nie bei diesen Patientinnen an. Durch die Vergleichbarkeit der Aussagen beider Methoden in der Erkennung von PR und CR kann auf die Plausibilität der Densitometrie-Daten geschlossen werden. Anhand der Kontrastmittelkinetik im MRT und im CPA-Ultraschall kann also eine Veränderung der Durchblutung im Mammakarzinom unter Chemotherapie erkannt werden und daraus auf das klinische Ansprechen des Tumors geschlossen

werden. Die Hypothese wird also bestätigt.

Aufgrund der kleinen Zahl untersuchter Patientinnen können jedoch keine Empfehlungen für die Praxis gegeben werden. Phase-III-Studien zum Vergleich verschiedener Methoden insbesondere mit dem zur Zeit geltenden „gold standard“ klinische Einschätzung werden durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse der Videodensitometrie unter der Chemotherapie mit Daten aus der internationalen Literatur kann nicht erfolgen, da ähnliche Untersuchungen bisher nicht publiziert wurden.

Tumurvaskularisation und automatisierte Mikroskop-Bildanalyse (AMBA)

Zunächst sollte der Vergleich der Tumordurchblutung mit der morphometrisch bestimmten Tumurvaskularisation erfolgen. Traditionell wurde untersucht, ob die funktionellen Untersuchungen zu den morphologischen Befunden passen, ob die Durchblutungsmessungen die morphologischen Besonderheiten der Tumurvaskularisation wiedergeben (siehe Einleitung). Im Rahmen dieser Studie sollten im Gegensatz dazu funktionelle Durchblutungsmessungen (CD) durch morphometrische Untersuchungen der Gefäße bestätigt werden. Es sollte zunächst untersucht werden, in welchen Gefäßen der Blutfluß mit der CD sichtbar gemacht werden kann.

In der vorgelegten Studie wurden 88 Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom präoperativ mit der CD untersucht. Von diesen Karzinomen wurden 34 mit einem dopplersonographisch homogenen Blutfluß im gesamten sonographischen Herdbefund und einem invasiven duktalem Mammakarzinom als Stichprobe zur Beantwortung spezieller Fragen zum Zusammenhang zwischen der Dopplersonographie und der Tumurvaskularisation ausgewählt.

Die histologischen Schnitte mit einem großen Anteil des invasiven Karzinoms wurden mit CD34-Antikörpern gefärbt und verschiedene Gefäßparameter (Gefäßanzahl, Lumenflächen, Gefäßwanddicke) in vorgegebenen, zufällig selektierten Gesichtsfeldern mit der automatisierten Mikroskop-Bildanalyse nach Scannen der Bilder und unter Verwendung eines für diese Untersuchung erstellten Computerprogramms analysiert. Der Vergleich dieser Daten mit den CD-Ergebnissen erfolgte getrennt nach großlumigen (Gefäßdurchmesser $>100\text{ }\mu\text{m}$) und kleinumigen Gefäßen (Gefäßdurchmesser $<100\text{ }\mu\text{m}$) und allen Gefäßen zusammen.

Bisher wurde bei Studien, welche die CD und die histologische Vaskularisation miteinander verglichen, angenommen, daß der Blutfluß homogen im Tumor ist (60,121). Nach Axelsson et al. (60) beträgt die Übereinstimmung der Untersuchungen zur Vaskularisation von Mammatumoren innerhalb der Untersucher und verschiedener Tumorregionen 73%. Die Studien von Vaupel (25) hingegen zeigten, daß besonders beim invasiven duktalem Mammakarzinom typischerweise eine inhomogene Vaskularisation (oder ein ungleichmäßig angelegtes Tumorgefäßbett) vorliegt und nur ca. 25% der Gefäße zu jedem beliebigen Zeitpunkt durchblutet sind. Das bedeutet jedoch nicht, daß nur wenige Regionen des Tumors durchblutet sind. Wäre dies so, müßten die invasiven duktalem Karzinome zum größten Teil nekrotisch aufgrund ihrer Minderdurchblutung sein. Vielmehr bedeutet dies, daß nicht immer alle angelegten Tumorgefäße von Blut durchflossen werden. Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Verteilung der dopplersonographisch sichtbaren Durchblutung und der inhomogenen Tumurvaskularisation bei invasiven duktalem Mammakarzinomen sind bisher nicht publiziert worden. Außerdem wurde bisher nicht bei der Untersuchung dieses Zusammenhanges von der Durchblutung ausgegangen und die Tumurvaskularisation zusätzlich computergestützt, also weitgehend objektiv untersucht.

Bisher wurden die Regionen, in denen die Vaskularisation beurteilt wurde, subjektiv vom Untersucher nach sogenannten „hot spots“, also Regionen, in denen sich viele Gefäße anfärben ließen, ausgewählt (55,56,123). Neu ist außerdem in diesem Zusammenhang die Untersuchung weiterer Parameter der Vaskularisation neben der Gefäßanzahl und ihrem Verhältnis zur Tumorfläche (micro vessel count oder micro vessel density), getrennt nach groß- und kleinumigen Tumorgefäßen.

Die erste Hypothese dieser Studie, daß es signifikante Unterschiede in Bezug auf die Tumurvaskularisation zwischen den dopplersonographischen Durchblutungsklassen (Pixelklassen) gibt, konnte bei einigen Vaskularisationsparametern bestätigt werden.

Die intratumoralen Gefäße in der vorgelegten Studie wurden mit der CD 34 Antikörperfärbung des Gefäßendothels (Antikörper gegen das Adhäsionsmolekül CD34) dargestellt. Die CD34-Färbung wurde wegen ihrer hohen Sensitivität in der Darstellung von menschlichen Gefäßen gewählt, obwohl es auch in geringem Maße das perivaskuläre Stroma mitfärben kann. Allerdings behaupten Fox et al. (124), daß die CD34-Färbung nur einen Teil des Gefäßendothels anfärbt. Sie stehen mit dieser Meinung allerdings allein in der verfügbaren internationalen Literatur. Durch die Markierung der angefärbten Gefäßregionen mit der PC-Mouse konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, daß markiertes perivaskuläres Stroma mit in die Auswertung einbezogen wurde. Die CD34 Färbung wird außerdem im Pathologischen Institut der Charité routinemäßig zum Nachweis einer vaskulären Tumordinfiltration (V1) durchgeführt. Es konnten also die Routineschnitte mit der Region der maximalen Invasion ohne zusätzliches Zuschneiden und Färben für die Untersuchung genutzt werden.

Möglich ist ebenfalls die Gefäßfärbung mit dem Faktor-VIII. Diese Färbung ist sehr spezifisch,

allerdings wenig sensitiv (55,56,62,122). Die CD31-Färbung (Antikörper, JC70, gegen CD31, Färbung gegen Endothelzellen-/ Thrombozyten-Adhäsionsmoleküle) ist kreuzreaktiv mit Fibroblasten und verschiedenen Tumor- und Plasmazellen (125,126). Aus diesen Gründen kombinierten Horak et al. (123) die Faktor VIII- mit der CD31-Färbung. Die größte Sensitivität wird mit der Mab E9-Färbung erzielt, allerdings nur am Gefrierschnitt. Trotz aller beschriebenen Vor- und Nachteile konnten mit allen hier angeführten Gefäßfärbetechniken vergleichbare Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen der Prognose einer Patientin und dem Gefäßreichtum des Mammakarzinoms erzielt werden.

Mit unserer Methode der CD34-Färbung und der automatisierten und quantitativen Messung von verschiedenen Parametern der Vaskularisation von Mammakarzinomen, getrennt nach groß- ($> 100 \mu\text{m}$ Durchmesser) und kleinumigen ($< 100 \mu\text{m}$ Durchmesser) Gefäßen, gelang es uns, Zusammenhänge zwischen der Vaskularisation und der CD (semiquantitative Darstellung als Pixelklassen) zu erkennen. Eine starke farbdopplersonographisch erkennbare Durchblutung korrelierte mit der Gesamtgefäßfläche aller Gefäße und der kleinumigen Gefäße, ein plausibles Ergebnis (25,121).

Die zweite Hypothese wurde ebenfalls bestätigt. Neben der Gefäßzahl kann auch an anderen Vaskularisationsparametern wie der Gefäßfläche der Zusammenhang zwischen Tumordurchblutung und Tumorstromversorgung nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die morphologisch-histologische Beobachtung, daß nicht die Dichte der Gefäße, sondern ihre Architektur, hier beschrieben durch die Gefäßflächen und die Unterteilung in großlumige und kleinumige Gefäße, die Blutflußgeschwindigkeit (in dieser Studie durch die Pixelklassen 1-3 wiedergeben) beeinflusst. Daneben beeinflusst der hydrostatische Druck des Tumors die Blutflußgeschwindigkeit (25).

Die Untersuchungen von Fox et al. (124) werden durch unsere Ergebnisse unterstützt. Dessen Arbeitsgruppe hat in Kenntnis der Nachteile der subjektiven Erhebung der microvessel density eine Computeranalyse der Gefäßanzahl und des Lumendurchmessers und der Lumenfläche von 211 invasiven Mammakarzinomen durchgeführt. Sie untersuchten dabei retrospektiv auch die Präparate (von 30 Patientinnen), die Horak et al. (123) in bezug auf die Vaskularisation manuell ausgezählt haben. Die Methode der Computeranalyse war mit unserer vergleichbar (Videokamera, Digitalisierung, manuelle Markierung der angefärbten Gefäßaußenränder und automatisiertes Zählen, Messen und Kalkulieren). Im Unterschied zu der hier vorgestellten Studie haben Fox et al. (124) die Gefäße mit CD31-Antikörpern angefärbt und nur die Außenränder der Gefäße markiert und damit eher die Gefäßaußendurchmesser und Gefäßaußenflächen und Gefäßgesamtflächen bestimmt. Im Gegensatz zu unserem Vorgehen wurde keine Unterscheidung zwischen klein- und großlumigen Tumorgefäßen gemacht. Es bestanden in der Arbeit von Fox et al. (124) signifikante Zusammenhänge zwischen der manuellen Auszählung der Gefäßanzahl und der Computeranalyse der Gefäßdurchmesser, Gefäßfläche und Gefäßanzahl. Außerdem bestand ein enger Zusammenhang (Korrelationskoeffizient von 0,81) zwischen der Anzahl der Gefäße und den Gefäßdurchmessern, Lumenflächen und angefärbten Flächen (entspricht der Gefäßgesamtfläche).

Nach der Untersuchung zum Zusammenhang von Tumorstromversorgung und Prognose konnte die Hypothese insgesamt bestätigt werden. Es wurde ein enger Zusammenhang von Vaskularisationsparametern zur histologisch nachgewiesenen Lymphknotenmetastasierung (pN1) nachgewiesen und ein geringerer Zusammenhang zur Tumorgroße. Hier war eine große Gefäßlumen- und Gefäßgesamtfläche der groß- und kleinumigen Gefäße ein Hinweis auf ein hohes Risiko für eine mögliche Lymphknotenmetastasierung. Mit steigender Tumorgroße nahmen die Gefäßflächen und die Anzahl der großlumigen Gefäße zu. Eine aktuelle Arbeit (35 Mammakarzinome mit Lymphknotenmetastasen (58)) unterstützt unsere Ergebnisse. Eine hohe Anzahl von mit CD31-gefärbten Gefäßen im Gesichtsfeld bei 250facher Vergrößerung (Mikrovessel-Score) korrelierte mit einer Lymphknotenmetastasierung und war ein unabhängiger Prognosefaktor.

Beim Vergleich unserer Ergebnisse muß man die zu anderen Untersuchern differenzierende Methodik der quantitativen Bestimmung der Vaskularisation beachten. In unserer Untersuchung wurden die Parameter der Gefäße mit einem Durchmesser von über $100 \mu\text{m}$ über das gesamte Tumorgewebe des ausgewählten Objektträgers bestimmt. Die Blutgefäße mit einem Durchmesser von unter $100 \mu\text{m}$ wurden in 10 zufällig gewählten Meßfenstern (Gesichtsfeldern) vermessen. Die Anzahl dieser kleinen Gefäße pro Meßfenster ($270057 \mu\text{m}^2$ oder ca. $0,27 \text{ mm}^2$) schwankte zwischen 3 und 44. Entsprechend schwankten die Mittelwerte der Gefäßflächen von Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld. Durch die Vermessung von 10 zufällig gewählten Gesichtsfeldern mit insgesamt durchschnittlich 100 Gefäßanschnitten konnte die Reproduzierbarkeit, ausgedrückt als Variationskoeffizient, bei Mehrfachmessung des gleichen Präparates unter 15% gesenkt werden. Horak et al. (123) zählten z.B. die Gefäße in mikroskopischen Zählfeldern einer Größe von $0,384$ und $0,196 \text{ mm}^2$ und benutzten die „Anzahl der Gefäße pro Quadratmillimeter“ innerhalb des gefäßreichsten Areals als Vaskularisationsparameter für ihre Berechnungen zum Zusammenhang zwischen Vaskularisation und Prognose. Grischke et al. (125) maßen das Volumen, die Oberfläche und die Länge der Gefäße pro Kubikmillimeter für ihre Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Vaskularisation und

spektraldopplersonographischen Parametern. Weidner et al. (57) berechneten aus verschiedenen mikroskopischen Zählfeldern die mittlere Gefäßzahl (microvessel count) pro 200x - und 400x - Feld (Gesichtsfeld in 200- oder 400-facher Vergrößerung) und teilten die Ergebnisse in 4 Klassen der Gefäßdichte (microvessel density) zur Berechnung des Zusammenhangs mit der Prognose ein. Bosari et al. (55) bestimmten die höchste und mittlere Anzahl der Gefäße von drei 200x-Feldern für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Tumorstadium und Prognose.

Die positiven Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Tumordurchblutung und Prognose werden von vielen (55,60,62,123,124,127), jedoch nicht von allen Studiengruppen (128), die sich mit diesem Thema beschäftigen, bestätigt. Nach Ellis und Fidler (129) ist es fragwürdig, warum Mammakarzinome aufgrund ihrer verstärkten Angiogenese schneller metastasieren sollen. Die Krebszellen durchlaufen verschiedene Stadien ihrer Entwicklung von der Stimulation der Angiogenese bis zur Metastasierung, so daß sie im Stadium der Angiogenese noch nicht in der Lage sein können zu metastasieren. Die frühen Tumorstadien sind zwar notwendige aber nicht zwangsläufige Bedingungen zur Metastasierung. Die Mammakarzinomzellen, die eine intensive Neovaskularisation induzieren, müssen nicht automatisch in der Lage sein, in das Gefäßsystem zu penetrieren und im Blut und in anderen Organen zu überleben. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung (58), daß die microvessel density in den Lymphknotenmetastasen niedriger ist als im Primärtumor. Erklärt wird dies mit immunologischen Reaktionen gegen die Tumorzellen und eine resultierende Hemmung der Angiogenese.

Die Erfassung der Tumorstadium ersetzt nicht die Lymphonodektomie und die histologische Aufarbeitung der entfernten Lymphknoten.

Unabhängig von diesen morphometrischen Ergebnissen konnten wir (130) ebenso wie Lee et al. und Sterns et al. (60,62.) zeigen, daß Patientinnen mit einem Mammakarzinom und Lymphknotenmetastasierung signifikant häufiger eine höhere als eine niedrigere Pixelklasse und höhere Flußgeschwindigkeiten in der CD aufweisen. Wir beobachteten außerdem signifikante Unterschiede in bezug auf die maximale systolische Geschwindigkeit zwischen den histologischen Grading-Gruppen 1 bis 3, jedoch nicht in bezug auf die Pixelklassen. Interessant an dieser Studie zur Tumorstadium ist auch die Beobachtung, daß von den 34 homogen durchbluteten Mammakarzinomen 22 (57.9%) Lymphknotenmetastasen (pN1) hatten, während es unter den 54 inhomogen durchbluteten Mammakarzinomen nur 8 Patientinnen (24.2%) waren. In einer aktuellen Arbeit von Leek et al. (86) wird auf den engen Zusammenhang von Tumornekrose, niedriger Tumordifferenzierung und hoher Gefäßbildung hingewiesen. Für aggressiv wachsende Tumoren ist eine Vielzahl von arterio-venösen Shunts typisch. In diesen Gewebearealen kann es zu keinem Blutgasausaustausch kommen. Die Folge ist die Gewebse Nekrose. Diese Ergebnisse bestätigen unsere zum Zusammenhang zwischen gemessener hoher Flußgeschwindigkeit (V_{max} , a-v-shunts) und einer geringen histologischen Differenzierung (G3) der Mammakarzinome. Auf die in der Arbeit von Leek et al. (86) beobachtete hohe Zahl von Makrophagen in diesen nekrotischen Karzinomen und deren fördernden Einfluß auf die Tumorstadium wurde bereits in der Einleitung (Abschnitt 1, Abbildung 1) hingewiesen.

Die Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Vaskularisation/Durchblutung und Prognose werden durch aktuellere Arbeiten zur Konzentration des wichtigsten Angiogenesefaktors VEGF in den Tumorzellen und Prognose unterstützt (131). Patientinnen mit einer hohen Konzentration von VEGF im Zytosol der Mammakarzinomzellen haben eine schlechtere Prognose, definiert als eine kürzere Lebenszeit (survival time) als die mit einer geringeren VEGF-Konzentration in den Karzinomzellen. In der multivariaten Analyse unter 525 Patientinnen (nur 25 Patientinnen erhielten eine adjuvante Chemotherapie, eine adjuvante Hormontherapie wurde nicht gegeben) war die intrazelluläre VEGF-Konzentration der härteste Prognosefaktor ($p=0,0199$) im Vergleich mit der Tumorstadium, dem Tumorstadium und der Östrogenrezeptorexpression und neben dem Tumorstadium ein unabhängiger Prognosefaktor. Besonders bei den östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen war die hohe VEGF-Tumorkonzentration ein negativer Prognosefaktor. Aufgrund der kleinen Zahl bisher publizierter Studien zur prognostischen Bedeutung des VEGF im Tumor und im Serum und zur Vaskularisation von Mammakarzinomen, hat dieser Faktor noch keine praktische Bedeutung für die Einschätzung der Prognose von Mamma-karzinompatientinnen und die Festlegung der adjuvanten oder neoadjuvanten Therapie. Die etablierten Prognosefaktoren heute sind das Alter der Patientin zum Zeitpunkt der Diagnose Mammakarzinom, die Tumorstadium, die Lymphknotenmetastasierung, das histologische Grading, die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, eventuell noch die Wachstumsfraktion (S-Phase, KI67), die Ploidie und die Expression des p53 und c-erbB2, besonders bei lymphknoten-negativen Patientinnen (132,133).

Da es gelungen ist, einen Zusammenhang zwischen Durchblutung und Tumorstadium und Tumorstadium und Prognose nachzuweisen, interessiert nun folgerichtig und der Systematik dieser Arbeit folgend, ob sich die Vaskularisationsparameter auch unter einer präoperativen Chemotherapie ändern und sie ebenso wie die Densitometrie (Abschnitt 4.2.3. , (134)) als Methode

zur Durchblutungsmessung zum Therapiemonitoring genutzt werden können. Zu Beginn sei aus Gründen der Plausibilität auf die weitestgehende Übereinstimmung der Meßergebnisse zur Vaskularisation in allen drei Studien dieser Habilitationsschrift hingewiesen. Zur automatisierten, gefäßmorphometrischen Untersuchung der Veränderung der Vaskularisation unter einer präoperativen Chemotherapie wurden 38 prä- und posttherapeutische Gewebeproben von 19 Patientinnen mit CD34-Antikörpern gefärbt und die Veränderung der Vaskularisationsparameter Anzahl der Gefäße, Gefäßinnenfläche, Gefäßinnen- und -außenumfang, Gefäßwanddicke unter der Chemotherapie quantitativ bei den kleinelumigen Gefäße (Durchmesser unter 100 µm) gemessen. Die Messung der Gefäßwanddicke wurde benutzt, um Aussagen zur Veränderung der Gefäßzusammensetzung (präformierte Gefäße, Arteriolen, Tumorgefäße) zu erhalten. Bei 12 dieser 19 Patientinnen konnte ein histologisches Ansprechen (Regressionsgrade 1-4) auf die Therapie festgestellt werden. Die Vaskularisationsparameter änderten sich jedoch kaum. Die mittlere Gefäßwanddicke blieb unverändert, auch bei den Karzinomen mit einer histologischen Tumorremission. Somit änderte sich die Charakteristik der Gefäße kaum. Die innere Gefäßfläche (oder Lumenfläche), in der Untersuchung zur Korrelation mit den Durchblutungsparametern und zur Prognoseabschätzung aus der Vaskularisation ein sehr guter Parameter, änderte sich ebenfalls nicht signifikant unter der Chemotherapie. Es ließ nur ein Parameter, der äußere Gefäßumfang, unter der Chemotherapie einen Trend erkennen ($p=0,09$), allerdings nur, wenn histologisch ein Ansprechen auf die Therapie zu erkennen war. Dieser Parameter gibt sehr gut quantitativ die Veränderungen der Form der Blutgefäße im Mammakarzinom wieder. Bei der subjektiven Betrachtung der histologischen Schnitte fällt auf, daß die geschlängelten Gefäße nach einer Chemotherapie, bei der eine histologische Remission erreicht wurde, seltener beobachtet wurden. Das zeigte sich objektiv in der Abnahme der gemessenen Gefäßaußenlänge. In der Studie von Grischke et al. (125) war die Gefäßlänge ein sehr guter Parameter zur Beurteilung der Unterschiede in der Vaskularisation zwischen malignen und benignen Herdbefunden der Mamma. Und die präoperative Chemotherapie hat zum Ziel, maligne Herdbefunde in „benignes“, tumorfreies Gewebe zu „verwandeln“. Insgesamt kann nach dieser objektiven Feststellung der Vaskularisationsparameter nur die Schlußfolgerung gezogen werden, daß sich die Tumolvaskularisation nur gering unter einer wirksamen Chemotherapie veränderte. Diese Veränderung war geringer ausgeprägt als die histologische Regression und war auch nur bei einem Parameter als Trend nachweisbar. Die Messung der Vaskularisationsparameter eignete sich nach diesen Ergebnissen kaum zur frühen Beurteilung des Ansprechens eines Mammakarzinoms. Die Hypothese dieser Untersuchung muß also widerrufen werden. Die Endothelzellen sind offensichtlich unempfindlicher als die Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie. Die Gefäße bleiben wie ein Gerüst innerhalb des nach der Chemotherapie nekrotischen oder fibrosierten Tumorareals stehen. Eine mögliche Erklärung ist die im Gegensatz zu den Tumorzellen sehr geringe Zellteilungsrate. Die von uns eingesetzten Chemotherapeutika wirken nur während der Zellteilung. Sie schädigen nur Zellen mit einer hohen Teilungsrate wie Tumorzellen, Haarwurzeln, Schleimhautzellen, kaum jedoch verhornende Epithelzellen, Nerven- und eben Endothelzellen. Unsere Ergebnisse befinden sich auf den ersten Blick im Widerspruch zu den bisher publizierten Studien. Makris et al. (59) haben histologische Schnitte von 90 in einer randomisierten Studie mit einer neoadjuvanten chemoendokrinen Therapie behandelten Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit denen von 105 in der gleichen Studie adjuvant behandelten Patientinnen nach CD34-Färbung in bezug auf die microvessel density in einem 250x Gesichtsfeld verglichen. In diesem nur indirekten Vergleich, da nicht die histologischen Schnitte vor und nach der Therapie einer Patientin miteinander verglichen wurden, war die microvessel density nach der Chemotherapie auch nur schwach signifikant niedriger (median 5,7 vs. 6,3, $p=0,025$) bei den neoadjuvant behandelten Patientinnen als bei den adjuvant behandelten ohne eine chemoendokrine Therapie. Die Autoren erklären diese Reduktion der Gefäßzahl durch einen sekundären Effekt durch die histologische Regression oder durch die direkte antiangiogenetische Wirkung der eingesetzten Medikamente. Durch das Ausbleiben oder die Verringerung der VEGF-Synthese durch die Tumorzellen kann durch ein physiologisches Absterben der Endothelzellen und deren fehlende Neubildung nach einer längeren Zeit mit einer Reduktion der Vaskularisation gerechnet werden. Das in dieser Studie neben der Chemotherapie eingesetzte Tamoxifen ist außerdem (in Kombination mit Retinoidsäure und Interferon alpha (135)) antiangiogenetisch wirksam. Die antitumorale Hormontherapie, z.B. mit Tamoxifen oder Letrozol, ist offensichtlich auch antiangiogenetisch wirksam, wie die Studie von Marson et al. (136) zeigt. Sie konnten eine signifikante Reduktion der mit Faktor VIII angefärbten Tumorgefäße in Karzinomen, die auf diese 3-6 Monate dauernde, präoperative Therapie angesprochen haben, im Gegensatz zu denen mit einem NC oder PD nachweisen. Da unter einer Chemotherapie die Tumorgefäße nahezu unbeeinflusst bleiben, muß diese Therapie durch eine antiangiogenetische unterstützt werden, um eine dauerhafte Rückbildung des Karzinoms

zu erreichen. Die gegenseitige Beeinflussung von Tumor- und Endothelzellen (two-cell-compartment-model) wurde bereits in der Einleitung (Abschnitt 1) dieser Arbeit beschrieben. Die antiangiogenetisch wirksamen Medikamente (insbesondere die Anti-VEGF-Medikamente wie SU5416) verringern außerdem den hydrostatischen Druck im malignen Tumor und verbessern damit die Diffusion der Chemotherapeutika in den Tumor und damit deren Wirksamkeit. Die Ergebnisse der vorliegenden Habilitationsschrift bestätigen damit die Forderung nach dem klinischen Einsatz von Antiangiogenese-Medikamenten, kombiniert mit einer Hormon- und Chemotherapie. Antiangiogenese-Medikamente bewirken einen Wachstumsstillstand (22), verlängern die dormancy der Tumorzellen und erzeugen keine Resistenz (24). Sie sind damit auch als Konsolidierungstherapie nach der Chemo- oder Hormontherapie geeignet.

Eine vielversprechende, die Patientin wenig belastende, schnelle und objektive Methode zum Monitoring unter präoperativer Chemotherapie soll die Messung der Angiogenese-Faktoren im Serum als Surrogatmarker für eine antiangiogenetisch wirksame Therapie sein (67). Die Erfahrungen mit der Messung des VEGF im Serum unserer Arbeitsgruppe (137) bestätigen, daß die Serumkonzentration des VEGF abhängig ist von der Dignität und damit der angiogenetischen Aktivität des Tumors. Eine Reduktion seiner angiogenetischen Potenz durch eine Chemotherapie (Störung der gegenseitigen parakrinen Beeinflussung der Tumorzelle und des umgebenden Stromas) müßte durch eine Absenkung der VEGF-Konzentration im Serum meßbar sein. Außerdem könnte diese Methode zum Monitoring einer gegen VEGF gerichteten antiangiogenischen Therapie eingesetzt werden.

Auf dem 21st San Antonio Breast Cancer Symposium im Dezember 1998 wurde z.B. das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1 (78)) im Serum als brauchbar für das Therapiemonitoring unter primärer Hormon- oder Chemotherapie eingeschätzt. VCAM (Steuerung der Endothel-Endothel-Interaktion) im Serum korrelierte in der Studie von Byrne et al. (78) mit dem klinischen Ansprechen (55 Patientinnen unter primärer Hormontherapie, $p < 0,001$), VEGF im Serum jedoch nicht.

Literaturverzeichnis

- 1 Goldman E: The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. . Lancet. Band ii. 1907, S.1236-1240,
- 2 Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?. J Natl Cancer Inst. Band 82. 1990, S.4-6,
- 3 Pluda JM: Tumor-associated angiogenesis - mechanism, clinical implications, and therapeutic strategies. Semin Oncol. 1997, 24, S.203-218,
- 4 Folkman J: . Angiogenesis inhibitors generated by tumors. Mol Med. 1995, 1, S.120-122,
- 5 Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J: Dormancy of micrometastases - balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med. 1995, 1, S.149-153,
- 6a Feldmann HJ, Sievers K, Füller J, Molls M, Löhr E: Evaluation of tumor blood perfusion by dynamic MRI and CT in patients undergoing thermoradiotherapy. Eur J Radiol. 1993, 16, S.224-229,
- 6b Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ: Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial-growth factor expression. . Cancer Res. 1996, 56, S.3436-3440,
- 7 Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Marubini E, Pozza F: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. . J Clin Oncol. 1994, 12, S.454-466,
- 8 Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. . Nature. 1996, 379, S.88-91,
- 9 Claffey KP, Robinson GS: Regulation of vegf/vpf expression in tumor cells - consequences for tumor-growth and metastasis. . Cancer Metastasis Rev. 1997, 15, S.165-176,
- 10 Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber DE, Vlodavsky I: A heparin-binding angiogenic protein -- basic fibroblast growth factor -- is stored within basement membrane. Am J Pathol. 1988, 130, S.393-400,
- 11 Polverini PJ, Leibovich JS: Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. . Lab Invest. 1984, 51, S.635-642,
- 12 Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science. 1994, 265, S.1582-1584,
- 13 Bunn HF, Poyton RO: Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev. 1996, 76, S.839-885,
- 14 Senger DR, Water L van de, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. Cancer and Met Rev. 1993, 12, S.303-324,
- 15 Konerding MA, Ackern C van, Fait E, Steinberg F, Streffer C: Morphologic aspects of tumor angiogenesis and microcirculation. In: Molls M, Vaupel P (eds) Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Hrsg.: Molls M, Vaupel P: Blood perfusion and microenvironment of human tumors1. 1 Berlin, Springer, 1998 S.5-17,
- 16 Endrich B, Vaupel P: The role of the microcirculation in the treatment of malignant tumors: facts and fiction. . Hrsg.: Molls M, Vaupel P: Blood perfusion and microenvironment of human tumors. 1 Berlin, Springer, 1998 S.19-39,
- 17 Boucher Y, Jain RK: Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. Cancer Res. 1992, 52, S.5110-5114,
- 18 Jain RK: Haemodynamic and transport barriers to the treatment of solid tumors. Int J Radiat Biol. 1991, 60, S.85-100,
- 19 Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D: Capillary

- endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*. 1987, 325, S.257-262,
- 20 Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E: Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87, S.3092,
 - 21 Podor TJ, Jirik FR, Loskutoff DJ, Carson DA, Lotz M: Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann NY Acad Sci*. 1989, 557, S.374-385,
 - 22 Folkman J: Angiogenic therapy. Hrsg.: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia, Lipincott-Raven, 1997 S.3075-3085,
 - 23 Harris AL: Hypoxia, a key regulator of tumor growth and target for therapy. . *Breast Cancer Res Treat*. 1998, 50 *Special issue*, S.226,
 - 24 Dreys J, Droll A, Mross K, Unger C: Angiogenesis inhibition: Drugs in clinical trials. . *Onkologie*. 1999, 22, S.282-290,
 - 25 Vaupel P: Tumor blood flow. Hrsg.: Molls M, Vaupel P: *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. 1 Berlin, Springer, 1998 S.40-45,
 - 26 Hill SA, Pigott KH, Saunders ML: Microregional blood flow in murine and human tumours assessed using laser Doppler microprobes. *Br J Cancer*. 1996, 74, S.260-263,
 - 27 Jirtle RL: Chemical modification of tumor blood flow. *Int J Hyperthermia*. 1988, 4, S.355-371,
 - 28 Feldmann HJ, Sievers K, Füller J, Molls M, Lühr E: Evaluation of tumor blood perfusion by dynamic MRI and CT in patients undergoing thermoradiotherapy. *Eur J Radiol*. 1993, 16, S.224-229,
 - 29 Laubenbacher C, Schwaiger M: The potential role of Positron Emission Tomography in Investigation of Microenvironment. Hrsg.: Molls M, Vaupel P: *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. 1 Berlin, Springer, 1998 S.161-191,
 - 30 Sohn C, Grischke EM, Wallwiener E, Kaufmann M, Fournier D von, Bastert G: Die sonographische Durchblutungsdiagnostik gut- und bösartiger Tumoren. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1992, 52, S.397-403,
 - 31 Sohn C, Wskott HP, Schießler M: Sensitivität neuer Farbsysteme: Maximum Entropy Method und Angio-Farbe. *Ultraschall in Med*. 1996, 17, S.138-142,
 - 32 Schliep R, Bauer A: Ultraschallkontrastmittel - Neue Perspektiven in der Ultraschalldiagnostik. *Radiologe*. 1996, 36, S.51-57,
 - 33 Cohen F, Kuwatsuru R, Shames D: Contrast-enhanced MRI estimation of altered capillary permeability in experimental mammary carcinomas following x-irradiation. *Invest Radiol*. 1995, 162, S.205-210,
 - 34 Sherif H, Mahfouz AE, Oellinger H, Hadijuana J, Blohmer JU, Taupitz M, Felix R, Hamm B: Peripheral Washout Sign on Contrast-enhanced MR Images of the Breast. *Radiology*. 1997, 205, S.209-213,
 - 35 Cyrlak D: Induced costs of low-cost screening mammography. *Radiology*. 1988, 168, S.661-662,
 - 36 Rimer BK, Schildkraut J: Cancer screening. Hrsg.: DeVita VT, Hellman S, Rosenber SA: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia, Lipincott-Raven, 1997 S.619-631,
 - 37 Schreer I, Eidtmann H: Früherkennung und Prognosefaktoren beim Mammakarzinom. *Onkologie*. 1998, 4, S.902-913,
 - 38 Blohmer JU, Hüttner C, Lichtenegger W: Qualitätssicherung des operativen Vorgehens bei nicht tastbaren Mammaläsionen. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1999, 59, S.M21-M24,
 - 39 Blohmer JU, Oellinger H, Schmidt C, Hufnagl P, Felix R, Lichtenegger W: Comparison of Various Imaging Methods with Particular Evaluation of Color-Doppler Sonography for Planning Surgery for Breast Tumors. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 1999, 262, S.159-171,
 - 40 Marquet KL, Funk A, Fendel H, Handt S: Der echodichte Randsaum und hyperreflexive Ausläufer: Sensible Kriterien maligner Prozesse in der Mammasonographie. *Geburtshilfe Frauenheilkd*.

- 1993, 53, S.20-23,
- 41 Stavros AT, Thickman D, Rapp CL, Dennis MA, Parker SH, Sisney GA: Solid breast nodules: use of sonography to distinguish between benign and malignant lesions. *Radiology*. 1995, 196, S.123-134,
 - 42 Teubner J, Bohrer M, Kaick G van, Georgi M: Echomorphologie des Mammakarzinoms. *Radiologe*. 1993, 33, S.277-286,
 - 43 Blohmer JU, Bollmann R, Heinrich G, Paepke S, Lichtenegger W: Die dreidimensionale Ultraschalluntersuchung (3D-Sonographie) der weiblichen Brustdrüse. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1996, 56, S.161-165,
 - 44 Blohmer JU, Oellinger H, Heinrich G, Grineisen Y, Paepke S, Bollmann R, Lichtenegger W: 3D-Ultraschall der weiblichen Brustdrüse. Hrsg.: Schmidt W: *Jahrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*. Band 1997/1998. Zülrich, Biermann, 1998 S.199-205,
 - 45 Blohmer JU, Guski H: Sonographische Kriterien zur Differentialdiagnose von Mammatumoren. Hrsg.: Sohn C, Holzgreve W: *Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Stuttgart, Thieme, 1995 S.671-718,
 - 46 Blohmer JU, Schmalisch G, Kürten A, Chaoui R, Lichtenegger W: Relevance of sonographic criteria to differential diagnosis of mammary tumour. *Eur J Ultrasound*. 1997, 6, S.35-41,
 - 47 Bader W, Böhmer S, Otto WR, Degenhardt F, Schneider J: Texturanalyse: Ein neues Verfahren zur Beurteilung sonographisch darstellbarer Herdbefunde der Mamma. Ein neues Verfahren zur Beurteilung sonographisch darstellbarer Herdbefunde der Mamma. *Bildgebung*. 1994, 61, S.284-290,
 - 48 Dudwiesus P: Physikalische Grundlagen. Hrsg.: Sohn C, Holzgreve W: *Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Stuttgart, Thieme, 1995 S.7-62,
 - 49 Huber S, Delorme S, Zuna I: Dynamische Erfassung der Kontrastmittelanflutung in der Dopplersonographie. *Gegenwärtiger Stand*. *Radiologe*. 1998, 38, S.390-393,
 - 50 Huber S, Helbich T, Kettenbach J, Dock W, Zuna I, Delorme S: Effects of microbubble contrast agent on breast tumors: computer-assisted quantitative assessment with color Doppler US - early experience. *Radiology*. 1998, 208, S.485-489,
 - 51 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer V: Update 1998. Hrsg.: Senn HJ, Gelber RD, Goldhirsch A, Thürlimann B: *Recent Results in Cancer Research*. 152. *Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer VI*. Berlin, Springer, 1998 S.481-487,
 - 52 Thomssen C, Jänicke F, Harbeck N, Pache L, Prechtel A, Schmitt M, Graeff H: Tumorproteasen im multivariaten prognostischen Vergleich und als Hilfe zur risikoadaptierten Therapieentscheidung. *Excerpta Oncologica*. 1997, 6, S.135-158,
 - 53 Schönborn I, Minguillon C, Lichtenegger W, Zschesche W, Spitzer E: c-erbB-2, EGF-Rezeptor, p53 und PCNA. Die prognostische Bedeutung neuer Faktoren für das Lymphknoten-negative Mammakarzinom. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1995, 55, S.566-571,
 - 54 Harbeck N, Henselmann B, Thomssen C, Pache L, Ulm K, Dettmar P, Nathrath W, Jänicke F, Schmitt M, Graeff H: Multivariater Vergleich neuerer tumorbiologischer Prognosefaktoren (unter Einschluß von S-Phase und MIB1) beim nodalnegativen Mammakarzinom. *Excerpta Oncologica*. 1997, 6, S.91-100,
 - 55 Bosari S, Lee AKC, DeLessis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML: Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*. 1992, 23, S.755-761,
 - 56 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G: Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J NCI*. 1992, 84, S.1875-1887,
 - 57 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med*. 1991, 324, S.1-7,

- 58 Arapandoni Dadioti-P, Giatromanolaki A, Trihia H, Harris AL. Koukourakis-MI: Angiogenesis in ductal breast carcinoma. Comparison of microvessel density between primary tumour and lymph node metastasis. *Cancer Lett.* 1999, 137, S.145-150,
- 59 Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, Dowsett M, Ashley SE. Harris AL: Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma. *Cancer.* 1999, 85, S.1996-2000,
- 60 Lee WJ, Chu JS, Huang CS, Chang MF, Chang KJ, Chen KM: Breast cancer vascularity: Color Doppler sonography and histopathology study. *Breast Cancer Res Treat.* 1996, 37, S.291-298,
- 61 Sohn C, Thiel C, Baudendiestel A, Kaufmann M, Bastert G: Is the sonographic degree of blood supply a new prognostic factor?. *Breast.* 1996, 5, S.110-112,
- 62 Sterns EE, SenGupta S, Saunders F, Zee B: Vascularity demonstrated by Doppler ultrasound and immunohistochemistry in invasive ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 1996, 40, S.197-203,
- 63 Peters-Engl C, Frank W, Medl M: Tumor flow in malignant breast tumors measured by Doppler ultrasound: An independent predictor of survival. *Breast Cancer Res Treat.* 1998, 50 *Special issue*, S.228,
- 64 Modzelewski RA, Davies P, Watkins SC, Auerbach R, Chang MJ, Johnson CS: Isolation and identification of fresh tumor-derived endothelial cells from a murine RIF-1 fibrosarcoma. *Cancer Res.* 1994, 54, S.336,
- 65 Oktaba AMC, Hunter WL, Aresenault AL: Taxol: A potent inhibitor of normal and tumor-induced angiogenesis. (Abstract 2707) . *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1995, 36, S.454,
- 66 Belotti D, Nicoletti I, Vergani V, Rieppi M, Drudis T, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G: Paclitaxel (Taxol), a microtubule affecting drug, inhibits tumor induced angiogenesis. (Abstract 397). *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1996, 37, S.57,
- 67 Harris AL : Anti-angiogenesis therapy and strategies for integrating it with adjuvant therapy. . Hrsg.: Senn HJ, Gelber RD, Goldhirsch A, Thürlimann B: *Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer.* Berlin, Springer, 1998 S.341-352,
- 68 Hortobagyi GN, Singletary SE, McNeese MB: Treatment of locally advanced and inflammatory breast cancer. Hrsg.: Harris JL: *Diseases of the breast.* Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996 S.585-599,
- 69 Blohmer JU, Paepke S, Grineisen Y, Lichtenegger W: Dose-intensified, neoadjuvant chemotherapy with the combination of Epirubicin/Ifosfamid or Docetaxel/Epirubicin in patients with IIIA/IIIB breast cancer: results of a phase II study. . *Proc Am Soc Clin Oncol.* 1998, 17, S.129a,
- 70 Blohmer JU, Paepke S, Kissner L, Elling D, Fleige B, Grineisen Y, Lichtenegger W: Dose-intensified, preoperative and adjuvant chemotherapy in patients with T3- and T4d-breast cancer: toxicity, clinical and pathological remission. *Zentralbl Gynäkol.* 1999, 121, S.522-526,
- 71 Hortobagyi GN, Buzdar AU: Locally advanced breast cancer: a review including the M.D. Anderson experience. Hrsg.: Ragaz J, Ariel IM: *High-risk breast cancer.* Berlin, Springer, 1991 S.382,
- 72 Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, Cruz AB Jr, Fisher ER, Wickerham DL, Wolmark N, DeCillis A, Hoehn JL, Lees AW, Dimitrov NV: Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol.* 1997, 15, S.2483-2493,
- 73 Minckwitz G von, Costa S, Eiermann W, Blohmer JU, Tulusan AH, Jackisch C, Kaufmann M: Maximized reduction of primary breast tumor size using preoperative chemotherapy with Adriamycin and Docetaxel. *J Clin Oncol.* 1999, 17, S.1-7,
- 74 Junkermann H, Fournier D von: Bildgebende Verfahren zur Beurteilung des Ansprechens des Mammakarzinoms auf eine präoperative Chemotherapie. *Radiologe.* 1997, 37, S.726-732,
- 75 Kurtz B, Achten Ch, Audretsch W, Rezai M, Urban P, ZochollG: MR mammographische

- Beurteilung des Tumoransprechverhaltens nach neoadjuvanter Radiochemotherapie lokal fortgeschrittener Mammakarzinome. *Fortschr Röntgenst.* 1996, 164, S.469-474,
- 76 Kalra R, Wade KE, Hands L, Styles P, Camplejohn R, Greenall M, Adams GE, Harris AL, Radda GK: Phosphomonoester is associated with proliferation in human breast cancer: a ³¹P MRS study. *Br J Cancer.* 1993, 67, S.1145-1153,
 - 77 Knopp MV, Heß T, Bachert P, Ende G, Junkermann H, Hestekamp T, Kaick G.van: Magnetresonanzspektroskopie des Mammakarzinoms. *Radiologe.* 1993, 33, S.300-307,
 - 78 Byrne GJ, Blann AD, Venizelos V, Iddon A, Howell A, Bundred NJ: Serum soluble VCAM: A surrogate marker of angiogenesis. *Breast Cancer Res Treatm.* 1998, 50 *Special issue*, S.330,
 - 79 Sohn C, Blohmer JU: Durchblutungsdiagnostik von Mammatumoren. Hrsg.: Sohn C, Blohmer JU: Mammasonographie. Ein systematisches Lehrbuch zur Technik und Befundinterpretation. 1 Stuttgart, Thieme, 1996 S.130-138,
 - 80 Sittek H, Keßler M, Reiser M, Hepp M: Mammographiescreening und qualitätsgesicherte Früherkennung in Deutschland. Hrsg.: Untch M, Konecny G, Sittek H, Keßler M, Reiser M, Hepp H: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. 1 München, Zuckschwerdt, 1998 S.193-219,
 - 81 Bloom HJG, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957, 11, S.359-377,
 - 82 Sinn HP, Schmid H, Junkermann H, Huober J, Leppien G, Kaufmann M, Bastert G, Otto HF: Histologische Regression des Mammakarzinoms nach primärer (neoadjuvanter) Chemotherapie. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1995, 54, S.552-558,
 - 83 Blohmer JU, Paepke S, Fleige U, Grineisen Y, Kissner L, Erhardt B, Elling D, Kohls A, Lichtenegger W: ADose-Intensified, Sequential Preoperative Chemotherapy with Epirubicin and Docetaxel in Patients with Inoperable and Non Metastatic Breast Cancer: A Prospective, Controlled, Multicentre Phase II Study. *Proc Am S Clin Oncol.* 1999, 18, S.89a,
 - 84 Dock W: Duplex sonography of mammary tumors: a prospective study of 75 patients. *J Ultrasound Med.* 1993, 12, S.79-82,
 - 85 Blohmer JU, Bollmann R, Schmalisch A, Chaoui R, Lau HU: Die Differentialdiagnose von Mammatumoren durch den Vergleich der Durchblutung des Tumors mit der kontralateralen Brust mittels farbkodierter, gepulster Dopplersonographie. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1995, 55, S.1-6,
 - 86 Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE: Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 1999, 79, S.991-995,
 - 87 Sahin-Akyar G, Sumer H: Color Doppler ultrasound and spectral analysis of tumor vessels in the differential diagnosis of solid breast masses. *Invest Radiol.* 1996, 31, S.72-79,
 - 88 Youssefzadeh S, Eibenberger K, Helbich T, Jakesz R, Wolf G: Use of resistance index for the diagnosis of breast tumours. *Clin Radiol.* 1996, 51, S.418-420,
 - 89 Jain RK: Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* 1988, 48, S.2641-2658,
 - 90 Kedar RP, Cosgrove DO, Smith IE, Mansi JL, Bamber JC: Breast carcinoma: Measurement of tumor response to primary medical therapy with color Doppler flow imaging. *Radiology.* 1994, 190, S.825-830,
 - 91 Mäurer J, William C, Schroeder R, Hidajad N, Hell B, Bier J, Weber S, Felix R: Evaluation of metastases and reactive lymph nodes in Doppler sonography using an ultrasound contrast enhancer. *Invest Radiol.* 1997, 32, S.441-446,
 - 92 Kurjak A, Salihagic A, Kupesic-Urek S: Clinical value of assessment of gynaecological tumour angiogenesis by transvaginal colour Doppler. *Ann Med.* 1992, 24, S.97-102,
 - 93 Madjar H, Vetter M, Prömpeler H, Breckwoldt M, Pfeleiderer A: Doppler measurement of breast vascularity in women under pharmacologic treatment of benign breast disease. *J Reprod Med.*

- 1993, 38, S.935-940,
- 94 Madjar H, Prömpele H, Wolfahrt R, Bauknecht T, Pfeiderer, A: Farbdopplerflußdaten von Mammatumoren. *Ultraschall Med.* 1994, 15, S.69-76,
 - 95 Schelling M, Gnirs J, Braun M, Busch R, Maurer S, Kuhn W, Schneider KTM, Graeff H: Optimized differential diagnosis of breast lesions by combined B-mode and color Doppler sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997, 10, S.48-53,
 - 96 Delorme S, Zuna I, Huber S, Albert B, Lohr F, Knopp V, Junkermann H, Kaik G van: Farb-Dopplersonographie bei Mammatumoren: Quantifizierung durch computergestützte Verfahren. *Tumordiagn u Ther.* 1995, 16, S.180-186,
 - 97 Cosgrove D, Eckersley R: Doppler indices in tumors--resolution of a dilemma?. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997, 10, S.9-11,
 - 98 Stuhmann M, Aronius R, Roefke C, Schietzel M: Vaskularisation von Mammatumoren: Einsatz des Ultraschallkontrastmittels in der Dignitätsbeurteilung. Vorläufige Ergebnisse. *RöFo.* 1998, 169, S.360-364,
 - 99 Fleischer AC, Jones III HW: Early detection of ovarian carcinoma with transvaginal sonography. 1 New York, Raven Press, 1993
 - 100 Shubik P: Vascularization of tumors: a review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1982, 103, S.211-226,
 - 101 Bamber JC, Eckersley, RJ, Bush NL, Bell DS, Crawford DC: Data processing for 3-dimensional visualization of tumor anatomy and blood flow. Hrsg.: Bellingham W: Visualization in biomedical computing. London, SPIE, 1992 S.651-663,
 - 102 Kedar RP, Cosgrove DO, Bamber JC, Bell DS: Automated quantification of color Doppler signals: a preliminary study in breast tumors. *Radiology.* 1995, 197, S.39-43,
 - 103 Oellinger H, Siewert C, Sherif HK, Blohmer JU, Hadijuana J, Lichtenegger W, Felix R: Is there a method to distinguish a fibroadenoma from a carcinoma in MR-female-breast-imaging (MRFBI)? . *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology, and Medicine.* 1996, 4 Suppl, S.204,
 - 104 Fischer U, V. Heyden D, Vosschenrich R, Vieweg I, Grabbe E: Signalverhalten maligner und benignen Läsionen in der dynamischer 2-D-MRT der Mamma. *Fortschr Roentgenstr.* 1993, 15814, S.287-297,
 - 105 Greenstein O: Staging of suspected breast cancer: Effect of MR imaging and MR-guided biopsy. *Radiology.* 1995, 196, S.115-122,
 - 106 Fisher B: The effect of recent findings from NASBP clinical trials on paradigms governing the therapy of primary invasive breast cancer. Hrsg.: Untch M, Konecny H, Sittok H, Keßler M, Reiser M, Hepp H: Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. München, Zuckschwerdt, 1998 S.193-219,
 - 107 Less JR, Skalak TC, Sevic EM, Jain RK: Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. *Cancer Res.* 1991, 51, S.265-273,
 - 108 Grüner C, Schönwälder A, Schulz-Wendland R, Lang N, Bautz W: Welche Rolle spielt die Farbdopplersonographie, unterstützt mit dem Echosignalverstärker Levovist□, in der komplementären Mammadiagnostik?. *Akt Radiol.* 1998, 8, S.58-62,
 - 109 Rubin JM, Bude RO, Carson PL, Bree RL, Adler RS: Power Doppler US: a potentially useful alternative to mean frequency-based color Doppler US. *Radiology.* 1994, 190, S.853-856,
 - 110 Cosgrove D: Why do we need contrast agents for ultrasound. *Clinical Radiology.* 1996, 51 Suppl 1, S.1-4,
 - 111 Blomley M: Functional imaging with microbubble agents. *Europ J Ultrasound.* 1997, EURODOP97, S.C6.5,
 - 112 Albrecht T, Patel N, Cosgrove DO, Jayaram V, Blomley MJ, Eckersley R: Enhancement of power Doppler signals from breast lesions with the ultrasound contrast agent EchoGen emulsion:

- subjective and quantitative assessment. *Acad Radiol.* 1998, *5 Suppl 1*, S.S195-S199,
- 113 Blohmer JU, Oellinger H, Grineisen Y, Paepke S, Siewert C, Siebert G, Felix R, Lichtenegger W: Changes in Spectral Doppler Measurement of Vmax after Administration of an Ultrasound Contrast Agent – A Possible New Variable for the Differential Diagnosis of Breast Lesions. *TumorDiagn u Ther.* 1999, *20*, S.1-7,
 - 114 Lück HJ, Thomssen C, du Bois A, Lisboa BW, Untch M, Kühnle H, Jänicke F, Meerpohl HG, Lindner C, Konecny G, Hecker D, Diergarten K: Preliminary results of a phase II study of epirubicin and paclitaxel as first-line treatment in patients with metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 1997, *24 Suppl 3*, S.S13-S16,
 - 115 Segel MC, Paulus D, Hortobagyi GN: Segel MC, Paulus D, Hortobagyi GN. *Radiology.* 1988, *169*, S.49-54,
 - 116 Knopp MV, Brix G, Junkermann HJ, Sinn HP: MR mammography with pharmacocinetic mapping for monitoring of breast cancer treatment during neoadjuvant therapy. *MRI Clin N Am.* 1994, *2*, S.633-652,
 - 117 Rieber A, Zeitler H, Rosenthal H, Görich J, Kreienberg R, Brambs HJ, Tomczak R: MRI of breast cancer: influence of chemotherapy on sensitivity. *British J Radiology.* 1997, *70*, S.452-458,
 - 118 Moon RB, Richards JH: Determination of intracellular pH by ³¹P-magnetic resonance. *J Biol Chem.* 1973, *248*, S.7276-7278,
 - 119 Thian CNG, Grundfest S, Vijayakumar S, Baldwin NJ, Mayors AW, Karalis I, Meaney TF, Shin KH, Thomas FJ, Tubbs R: Therapeutic response of breast carcinoma monitored by ³¹P MRS in si. *Magnetic Resonance in Medicine* . 1989, *10*, S.125-134,
 - 120 Smith IC: Smith IC. *Eur J Surg Oncol.* 1998, *24*, S.320-329,
 - 121 Blohmer JU, Gohlke A, Hufnagl P, Schneider U, Lichtenegger W: Correlation between morphologic parameters of vascularisation, color Doppler image features (CD) and lymph-node metastasis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treatm* . 1998, *50*, S.331,
 - 122 Axelsson K, Ljung BE, Moore DH 2nd, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH: Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1995, *87*, S.997-1008,
 - 123 Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris A: Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 340, *1120-1124*,
 - 124 Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Withehouse RM, Gatter KC, Harris AL: Quantification and prognostic value of breast cancer angiogenesis: Comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathology.* 1995, *177*, S.275-283,
 - 125 Grischke EM, Kaufmann M, Eberlein-Gonska M, Mattfeldt T, Sohn Ch, Bastert G: Angiogenesis as a diagnostic factor in primary breast cancer: microvessel quantitation by stereological methods and correlation with color Doppler sonography. *Onkologie.* 1994, *17*, S.35-42,
 - 126 Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY: JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol.* 1990, *43*, S.752-757,
 - 127 Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T: Tumor angiogenesis in breast cancer: ist importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treatm.* 1995, *36*, S.193-204,
 - 128 Hall N, Fish D, Hunt N, Goldin R, Guillou P, Monson J: Hall N, Fish D, Hunt N, Goldin R, Guillou P, Monson J. *Surg Oncol.* 1992, *1*, S.223-229,
 - 129 Ellis LM, Fidler IJ: Angiogenesis and breast cancer metastasis. *Stuttgart, Thieme,* 1995 S.388-390,
 - 130 Blohmer JU, Oellinger H, Schmidt C, Lichtenegger W: Präoperative Prognoseeinschätzung von Patientinnen mit einem Mammakarzinom durch die farbkodierte Dopplersonographie.

- Geburtsh Frauenheilkd. 1998, 58, S.6-12,
- 131 Linderholm B, Tavelin, B, Grankvist K, Henriksson R: Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. J Clin Oncol. 1998, 16, S.3121-3128,
- 132 Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer: Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. Cancer. 1993, 72, S.3641-3647,
- 133 Jonat W, Eidtmann H, Friedrichs K: Prognosefaktoren beim Mammakarzinom. Gynäkologe. 1994, 27, S.37-44,
- 134 Blohmer JU, Reinhardt M, Paepke S, Huttner C, Lichtenegger W, Fritzsche T: Densitometry after injection of Levovist in the examination of focal breast lesions - preliminary results. Eur J Ultrasound. 1997, 6 Suppl 2, S.S26,
- 135 Mross K, Hauns B, Häring B, Stephan P, Gastl G, Unger C: Phase II trial with retinoid acid, interferon alpha and tamoxifen (RITA) in metastatic breast cancer patients. J Cancer Res Clin Oncol. 1998, 124, S.123,
- 136 Marson LP, Kurian K, Dixon JM, Miller WR: The effect of primary endocrine therapy on breast cancer angiogenesis. Breast Cancer Res Treatm. 1998, 50, S.330,
- 137 Ernhardt B, Blohmer JU, Schuerenkaemper P, Lichtenegger W: Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor with Pathohistological Parameters in Breast Tumors: Preliminary Results. Breast Cancer Res Treatm. 1999, 57, S.116,

Anhang

Tabelle 34: Datensatz aus der Videodensitometrie einer Patientin mit einem Mammakarzinom

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
0	464768	216320	105232	143216	1862	249	116	56	76
0	547672	254496	126168	167008	2078	263	122	60	80
0	519352	242464	119512	157376	2102	247	115	56	74
0	365584	166000	87760	111824	1522	240	109	57	73
1	438560	200848	102480	135232	1842	238	109	55	73
1	457424	209968	107680	139776	1900	240	110	56	73
1	423192	191200	99464	132528	1746	242	109	56	75
1	304320	137600	69440	97280	1264	240	108	54	76
1	319672	144400	75320	99952	1382	231	104	54	72
2	478200	222080	109176	146944	1856	257	119	58	79
2	542040	251584	127560	162896	2096	258	120	60	77
2	478240	221600	111680	144960	1792	266	123	62	80
2	464704	215968	109952	138784	1824	254	118	60	76
2	449304	207216	105848	136240	1746	257	118	60	78
3	546208	254656	127424	164128	2156	253	118	59	76
3	459960	213600	104616	141744	1836	250	116	56	77
3	314064	143856	69504	100704	1272	246	113	54	79
3	443112	201056	101480	140576	1840	240	109	55	76
3	523192	236816	120776	165600	2122	246	111	56	78
4	574248	270032	127832	176384	2282	251	118	56	77
4	463296	214624	108000	140672	1878	246	114	57	74
4	377960	172944	86712	118304	1548	244	111	56	76
4	470792	216320	109528	144944	1936	243	111	56	74
4	560712	260704	129976	170032	2184	256	119	59	77
5	552232	256848	124936	170448	2178	253	117	57	78
5	424152	195344	99544	129264	1712	247	114	58	75
5	443056	206784	102800	133472	1792	247	115	57	74
5	577224	273536	130952	172736	2218	260	123	59	77
5	573776	266800	132352	174624	2168	264	123	61	80
6	424096	194640	98752	130704	1662	255	117	59	78
6	416840	188432	98616	129792	1724	241	109	57	75
6	442296	203408	100312	138576	1776	249	114	56	78
6	462976	210976	107168	144832	1818	254	116	58	79
6	486728	223760	113016	149952	1928	252	116	58	77
7	337320	151792	80712	104816	1436	234	105	56	72
7	368304	165216	88736	114352	1486	247	111	59	76
7	559272	256832	127512	174928	2338	239	109	54	74

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
7	477400	216432	111016	149952	1936	246	111	57	77
7	415144	189152	97784	128208	1674	247	112	58	76
8	395232	180096	91936	123200	1640	240	109	56	75
8	542512	253008	127792	161712	2210	245	114	57	73
8	620664	291856	141832	186976	2366	262	123	59	79
8	594528	275200	136544	182784	2290	259	120	59	79
8	451280	206832	102432	142016	1796	251	115	57	79
9	555160	257600	129176	168384	2162	256	119	59	77
9	877872	418512	199088	260272	3118	281	134	63	83
9	769080	365568	178168	225344	2726	282	134	65	82
9	921656	429424	211016	281216	3574	257	120	59	78
9	740248	345344	170440	224464	2838	260	121	60	79
10	1373848	647424	311976	414448	5290	259	122	58	78
10	1590208	750480	358112	481616	5824	273	128	61	82
10	1618552	768144	370760	479648	5902	274	130	62	81
10	1363680	641808	315312	406560	5010	272	128	62	81
10	1677016	788672	391784	496560	6106	274	129	64	81
11	2437504	1164000	559840	713664	8712	279	133	64	81
11	2926376	1398400	689240	838736	10034	291	139	68	83
11	2646912	1261024	610304	775584	8930	296	141	68	86
11	2434024	1158272	564488	711264	8460	287	136	66	84
11	3736216	1788160	863928	1084128	13014	287	137	66	83
12	4215344	2024032	977456	1213856	14612	288	138	66	83
12	4624920	2215552	1105656	1303712	15270	302	145	72	85
12	3879576	1851536	906808	1121232	13228	293	139	68	84
12	3998960	1906368	939328	1153264	13958	286	136	67	82
12	5966976	2859504	1402192	1705280	20450	291	139	68	83
13	5738416	2741552	1353824	1643040	19428	295	141	69	84
13	4447192	2117440	1069592	1260160	14544	305	145	73	86
13	4539128	2179072	1073192	1286864	15476	293	140	69	83
13	6650024	3166416	1585240	1898368	22564	294	140	70	84
13	6737720	3234576	1584744	1918400	22568	298	143	70	85
14	5355872	2545776	1269600	1540496	18084	296	140	70	85
14	4255224	2029536	993400	1232288	14710	289	137	67	83
14	5571496	2663984	1302216	1605296	19420	286	137	67	82
14	6432056	3089920	1512952	1829184	21610	297	142	70	84
14	5789568	2782976	1370320	1636272	19402	298	143	70	84
15	4724576	2254992	1106368	1363216	16350	288	137	67	83
15	5206032	2497184	1213760	1495088	18174	286	137	66	82
15	7152152	3428976	1722808	2000368	21918	326	156	78	91

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
15	6979056	3349824	1649936	1979296	22214	314	150	74	89
15	5769112	2751168	1356456	1661488	19662	293	139	68	84
16	5710672	2703360	1333744	1673568	19738	289	136	67	84
16	6305104	3009744	1486976	1808384	21158	298	142	70	85
16	6526992	3087504	1575728	1863760	21776	299	141	72	85
16	5755468	2702304	1380892	1672272	19030	302	142	72	87
16	4459408	2093824	1066112	1299472	15058	296	139	70	86
17	4703816	2218960	1116808	1368048	15542	302	142	71	88
17	6973184	3286528	1668832	2017824	22634	308	145	73	89
17	6677272	3172016	1597256	1908000	21192	315	149	75	90
17	5753592	2735728	1375256	1642608	19014	302	143	72	86
17	5016160	2370240	1194368	1451552	17160	292	138	69	84
18	6380280	3047184	1499816	1833280	20774	307	146	72	88
18	6663448	3176720	1575080	1911648	21576	308	147	73	88
18	5168168	2443056	1201960	1523152	18238	283	133	65	83
18	4464344	2125664	1036792	1301888	16106	277	131	64	80
18	6596296	3129904	1547608	1918784	22292	295	140	69	86
19	6992608	3313504	1676896	2002208	22942	304	144	73	87
19	6043216	2843008	1461440	1738768	19576	308	145	74	88
19	5226608	2462928	1267408	1496272	17462	299	141	72	85
19	5109792	2431936	1197104	1480752	17488	292	139	68	84
19	6491656	3072608	1544424	1874624	21358	303	143	72	87
20	5846224	2777136	1390624	1678464	19280	303	144	72	87
20	5712400	2712800	1340608	1658992	19772	288	137	67	83
20	5375800	2514752	1268664	1592384	19728	272	127	64	80
20	6637976	3119696	1576408	1941872	23206	286	134	67	83
20	5619752	2647664	1350680	1621408	18758	299	141	72	86
21	4567400	2168848	1073912	1324640	15766	289	137	68	84
21	3651400	1706848	863960	1080592	13332	273	128	64	81
21	5035600	2394208	1152464	1488928	17604	286	136	65	84
21	5861664	2801488	1382656	1677520	19324	303	144	71	86
21	5640672	2677488	1342096	1621088	18664	302	143	71	86
22	4721448	2232272	1113096	1376080	16418	287	135	67	83
22	5234368	2480016	1225200	1529152	18120	288	136	67	84
22	5988208	2836928	1413648	1737632	20222	296	140	69	85
22	4862944	2299168	1153472	1410304	16778	289	137	68	84
22	3152880	1484960	742128	925792	10682	295	139	69	86
23	2831376	1344416	654768	832192	9878	286	136	66	84
23	4711720	2227456	1091768	1392496	16880	279	131	64	82
23	5120408	2433600	1185064	1501744	17868	286	136	66	84

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
23	3885800	1840816	902168	1142816	14110	275	130	63	80
23	3169488	1493760	739408	936320	11820	268	126	62	79
24	4724944	2229632	1086736	1408576	16496	286	135	65	85
24	5131904	2450288	1200144	1481472	17812	288	137	67	83
24	4587776	2167712	1090240	1329824	15910	288	136	68	83
24	3945560	1850992	928984	1165584	14032	281	131	66	83
24	3594648	1686032	851672	1056944	12768	281	132	66	82
25	3487544	1643824	829208	1014512	12522	278	131	66	81
25	3048856	1462288	681048	905520	10744	283	136	63	84
25	2035904	954080	486048	595776	7226	281	132	67	82
25	2654152	1257632	618712	777808	9042	293	139	68	86
25	3743560	1790528	871848	1081184	12556	298	142	69	86
26	3548832	1696992	811728	1040112	12196	290	139	66	85
26	2966832	1414224	682992	869616	10522	281	134	64	82
26	2478040	1160064	572952	745024	9032	274	128	63	82
26	2638360	1221216	619064	798080	9270	284	131	66	86
26	2342192	1086000	555488	700704	8164	286	133	68	85
27	2197936	1036624	508128	653184	7736	284	134	65	84
27	2413112	1131344	577672	704096	8086	298	139	71	87
27	2897152	1353216	679984	863952	9864	293	137	68	87
27	2780496	1297696	648512	834288	9880	281	131	65	84
27	2497728	1170928	588352	738448	8954	278	130	65	82
28	1819968	852480	419600	547888	6532	278	130	64	83
28	1881200	876688	437840	566672	6960	270	125	62	81
28	2389504	1123744	549280	716480	8464	282	132	64	84
28	2105564	972696	490260	642608	7265	289	133	67	88
28	1954592	910992	462112	581488	6760	289	134	68	86
29	1668656	774896	391856	501904	6128	272	126	63	81
29	1920400	893104	448800	578496	6924	277	128	64	83
29	2697200	1252672	634320	810208	9534	282	131	66	84
29	1822112	840320	428592	553200	6898	264	121	62	80
29	1467592	677600	341320	448672	5466	268	123	62	82
30	2366952	1099056	549800	718096	8840	267	124	62	81
30	2617456	1219632	608064	789760	9580	273	127	63	82
30	2238888	1049824	529832	659232	8138	275	129	65	81
30	1772192	822768	428224	521200	6254	283	131	68	83
30	1594296	743008	370984	480304	5694	279	130	65	84
31	1970048	924832	462720	582496	6990	281	132	66	83
31	2148240	1004512	511712	632016	7468	287	134	68	84
31	1665040	779360	393216	492464	6102	272	127	64	80

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
31	1331312	616896	306416	408000	4888	272	126	62	83
31	1682880	783792	390352	508736	5998	280	130	65	84
32	1902080	891392	443344	567344	6890	276	129	64	82
32	1858416	861120	423088	574208	7024	264	122	60	81
32	1424776	654288	330648	439840	5390	264	121	61	81
32	1704608	788736	391344	524528	6156	276	128	63	85
32	1594384	738176	380896	475312	5742	277	128	66	82
33	1617304	751264	373080	492960	6018	268	124	61	81
33	985520	448592	231520	305408	3758	262	119	61	81
33	862976	396880	203216	262880	3284	262	120	61	80
33	2201928	1024464	517192	660272	8100	271	126	63	81
33	2150888	1005744	505944	639200	7670	280	131	65	83
34	1338160	617680	323584	396896	4748	281	130	68	83
34	1129896	520096	274840	334960	4026	280	129	68	83
34	1516288	703552	362512	450224	5596	270	125	64	80
34	2120320	1003824	495312	621184	7576	279	132	65	81
34	1761480	824192	418104	519184	6192	284	133	67	83
35	1265312	587248	295456	382608	4668	271	125	63	81
35	1648720	764416	377536	506768	6154	267	124	61	82
35	1806528	845888	420096	540544	6618	272	127	63	81
35	2138168	1006112	501016	631040	7510	284	133	66	84
35	1696904	790800	397400	508704	6232	272	126	63	81
36	1755992	820784	406376	528832	6258	280	131	64	84
36	2682864	1250240	614928	817696	9694	276	128	63	84
36	2335400	1087424	539960	708016	8512	274	127	63	83
36	1840832	853376	428736	558720	6754	272	126	63	82
36	1566648	727120	371480	468048	5954	263	122	62	78
37	2002240	931872	471760	598608	7132	280	130	66	83
37	1976288	915072	473888	587328	7112	277	128	66	82
37	1514896	705104	360480	449312	5208	290	135	69	86
37	1231840	568864	290032	372944	4308	285	132	67	86
37	1551184	716816	376240	458128	5492	282	130	68	83
38	1848936	861040	431624	556272	6682	276	128	64	83
38	1575624	733072	363928	478624	5788	272	126	62	82
38	1605792	744192	370864	490736	6132	261	121	60	80
38	2459448	1154992	560664	743792	8910	276	129	62	83
38	3565464	1688976	832840	1043648	12450	286	135	66	83
39	2785648	1317504	642768	825376	9880	281	133	65	83
39	1627440	754688	374192	498560	5862	277	128	63	85
39	1883736	891200	428568	563968	6572	286	135	65	85

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
39	2592560	1206656	605584	780320	9572	270	126	63	81
39	2238976	1031152	530544	677280	8116	275	127	65	83
40	1266712	584784	302824	379104	4574	276	127	66	82
40	1239968	572848	298368	368752	4474	277	128	66	82
40	1629760	754688	389168	485904	5990	272	125	64	81
40	1540424	710656	367224	462544	5572	276	127	65	83
40	1140912	529296	267552	344064	4010	284	131	66	85
41	942072	441728	221224	279120	3260	288	135	67	85
41	1804304	851296	410064	542944	6758	266	125	60	80
41	2035040	966512	462688	605840	7234	281	133	63	83
41	1747624	813248	406536	527840	6340	275	128	64	83
41	1252176	579376	293120	379680	4712	265	122	62	80
42	1483776	687248	351520	445008	5664	261	121	62	78
42	1836144	859664	429136	547344	6710	273	128	63	81
42	2412536	1131840	552376	728320	8858	272	127	62	82
42	1888472	881168	437736	569568	7122	265	123	61	79
42	1392512	649856	322496	420160	5340	260	121	60	78
43	1592272	737776	372032	482464	5694	279	129	65	84
43	1532680	718544	362296	451840	5734	267	125	63	78
43	1492720	693984	351600	447136	5458	273	127	64	81
43	1427912	657392	336872	433648	5468	261	120	61	79
43	1965584	910048	468016	587520	7062	278	128	66	83
44	1809016	844160	439384	525472	6466	279	130	67	81
44	1586920	737888	380152	468880	5708	278	129	66	82
44	1195328	549280	283104	362944	4272	279	128	66	84
44	1473952	682304	355712	435936	5206	283	131	68	83
44	1913104	882512	459344	571248	6800	281	129	67	84
45	1581704	729248	381992	470464	5684	278	128	67	82
45	1381056	642048	318496	420512	5022	275	127	63	83
45	1559560	724944	353544	481072	5690	274	127	62	84
45	1415664	655648	334336	425680	5182	273	126	64	82
45	971544	444384	229496	297664	3638	267	122	63	81
46	748720	341200	175680	231840	2888	259	118	60	80
46	1096840	503376	253896	339568	4268	256	117	59	79
46	2064464	974400	471312	618752	7452	277	130	63	83
46	2077144	968480	481992	626672	7410	280	130	65	84
46	1241592	575904	288952	376736	4534	273	127	63	83
47	1143728	529472	271968	342288	4226	270	125	64	80
47	1224680	567616	291096	365968	4324	283	131	67	84
47	1011280	474592	233456	303232	3528	286	134	66	85

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
47	761208	348240	179608	233360	2728	279	127	65	85
47	1109032	503360	269368	336304	4028	275	124	66	83
48	1187768	548464	279992	359312	4276	277	128	65	84
48	1256112	578816	297776	379520	4452	282	130	66	85
48	1075096	496624	252104	326368	3932	273	126	64	83
48	738064	329424	176336	232304	2838	260	116	62	81
48	1430952	659456	328856	442640	5298	270	124	62	83
49	1369008	631184	314016	423808	5002	273	126	62	84
49	924744	420240	216728	287776	3608	256	116	60	79
49	653360	290928	158944	203488	2646	246	109	60	76
49	802920	367104	182472	253344	3168	253	115	57	79
49	938272	424432	223056	290784	3692	254	114	60	78
50	818352	374832	189536	253984	3206	255	116	59	79
50	797784	365184	187496	245104	3078	259	118	60	79
50	1345304	621136	321736	402432	4970	270	124	64	80
50	1662936	772064	382952	507920	6074	273	127	63	83
50	1403568	654256	329824	419488	5104	274	128	64	82
51	1024624	473088	241680	309856	3790	270	124	63	81
51	977248	445936	230368	300944	3798	257	117	60	79
51	1266416	589280	295424	381712	4908	258	120	60	77
51	1787152	809952	420640	556560	7074	252	114	59	78
51	1004560	450864	240224	313472	4072	246	110	58	76
52	285296	125168	69472	90656	1154	247	108	60	78
52	642656	284496	155152	203008	2784	230	102	55	72
52	1764488	820048	407240	537200	6834	258	119	59	78
52	1122024	509280	260200	352544	4656	240	109	55	75
52	1042888	467792	246424	328672	4420	235	105	55	74
53	977480	437440	234184	305856	3954	247	110	59	77
53	1598016	732336	378272	487408	5812	274	126	65	83
53	1599584	737664	375232	486688	6074	263	121	61	80
53	1084704	498032	255040	331632	4168	260	119	61	79
53	1049056	475952	246544	326560	4182	250	113	58	78
54	1511584	693616	355792	462176	5638	268	123	63	81
54	1521344	707664	354032	459648	5672	268	124	62	81
54	1044272	479504	245776	318992	3978	262	120	61	80
54	733448	335824	171240	226384	2742	267	122	62	82
54	1130960	522192	262720	346048	4290	263	121	61	80
55	1552080	709536	365792	476752	5896	263	120	62	80
55	1036824	473040	242120	321664	3950	262	119	61	81
55	833824	380576	198832	254416	3132	266	121	63	81

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
55	944000	425008	227088	291904	3780	249	112	60	77
55	1447784	661728	336904	449152	5498	263	120	61	81
56	1296120	586064	309128	400928	5034	257	116	61	79
56	765440	346080	184112	235248	3018	253	114	61	77
56	879424	400128	208544	270752	3398	258	117	61	79
56	1406592	648128	325728	432736	5252	267	123	62	82
56	1243088	569536	292080	381472	4504	275	126	64	84
57	1054360	483744	250488	320128	3882	271	124	64	82
57	669952	309280	154080	206592	2402	278	128	64	86
57	1219664	562880	289680	367104	4462	273	126	64	82
57	2189752	1027728	520520	641504	7694	284	133	67	83
57	2526176	1176464	589920	759792	8840	285	133	66	85
58	2362496	1097552	546160	718784	8892	265	123	61	80
58	1850048	841680	428224	580144	6914	267	121	61	83
58	1870104	868144	432536	569424	6996	267	124	61	81
58	1576608	738384	375344	462880	5884	267	125	63	78
58	1212016	560528	285536	365952	4520	268	124	63	80
59	1179392	544000	273408	361984	4504	261	120	60	80
59	1317248	612512	308464	396272	5042	261	121	61	78
59	1539976	715520	359144	465312	5582	275	128	64	83
59	1245136	573968	293312	377856	4650	267	123	63	81
59	827896	383776	196056	248064	3066	270	125	63	80
60	1073336	485904	257896	329536	3976	269	122	64	82
60	1335368	624112	308440	402816	4772	279	130	64	84
60	1419936	658992	336496	424448	5118	277	128	65	82
60	1164144	541456	272480	350208	4154	280	130	65	84
60	1420552	661920	327432	431200	5094	278	129	64	84
61	1515160	703824	351528	459808	5506	275	127	63	83
61	1848000	870688	426624	550688	6366	290	136	67	86
61	1905368	898576	446056	560736	6726	283	133	66	83
61	1256448	584080	288992	383376	4612	272	126	62	83
61	1176120	537392	278024	360704	4432	265	121	62	81
62	1386048	638048	325296	422704	5082	272	125	64	83
62	1516560	690080	360464	466016	5636	269	122	63	82
62	1004320	461680	233328	309312	3654	274	126	63	84
62	1106856	502928	258808	345120	4274	258	117	60	80
62	1620688	755824	371104	493760	6014	269	125	61	82
63	1611152	735008	381584	494560	5976	269	122	63	82
63	946856	442912	221592	282352	3418	277	129	64	82
63	1044840	485248	241592	318000	3816	273	127	63	83

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
63	1191888	559792	276496	355600	4268	279	131	64	83
63	1283688	599792	303864	380032	4400	291	136	69	86
64	1296400	600448	302496	393456	4578	283	131	66	85
64	1359848	627600	318632	413616	5094	266	123	62	81
64	855864	393824	199768	262272	3156	271	124	63	83
64	1091104	501888	255200	334016	3808	286	131	67	87
64	1182536	542224	281096	359216	4060	291	133	69	88
65	1587056	710560	389456	487040	5492	288	129	70	88
65	1563176	696640	379256	487280	5594	279	124	67	87
65	1411792	631072	344128	436592	5074	278	124	67	86
65	1862800	837360	451392	574048	6674	279	125	67	86
65	1829152	829632	443296	556224	6312	289	131	70	88
66	1051056	488368	244320	318368	3860	272	126	63	82
66	1318152	612000	309816	396336	4634	284	132	66	85
66	1574664	735840	371352	467472	5544	284	132	66	84
66	1366792	629600	328440	408752	4828	283	130	68	84
66	1180704	542128	281552	357024	4066	290	133	69	87
67	1121608	510160	276296	335152	3890	288	131	71	86
67	1557328	716496	370912	469920	5448	285	131	68	86
67	1467816	684128	346216	437472	5168	284	132	66	84
67	1039864	484672	241048	314144	3660	284	132	65	85
67	861504	399840	204048	257616	3220	267	124	63	80
68	1175344	529728	280032	365584	4364	269	121	64	83
68	1321632	607200	306832	407600	4986	265	121	61	81
68	1148304	531904	272864	343536	4288	267	124	63	80
68	911680	420352	216176	275152	3206	284	131	67	85
68	799512	378064	183128	238320	2984	267	126	61	79
69	1132576	523776	264032	344768	4384	258	119	60	78
69	1540552	700944	369032	470576	5760	267	121	64	81
69	1176760	545344	277944	353472	4386	268	124	63	80
69	1244352	566464	294944	382944	4564	272	124	64	83
69	1204416	552224	283232	368960	4278	281	129	66	86
70	1839832	853312	431096	555424	6656	276	128	64	83
70	1414208	652048	329040	433120	5160	274	126	63	83
70	1059320	483296	250536	325488	4092	258	118	61	79
70	1266160	581008	293808	391344	4870	259	119	60	80
70	1551216	719296	359552	472368	5742	270	125	62	82
71	1261472	575472	290816	395184	4744	265	121	61	83
71	696312	313216	163576	219520	2672	260	117	61	82
71	1048728	479136	248424	321168	3942	266	121	63	81

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
71	1526568	695120	358728	472720	5582	273	124	64	84
71	2745536	1230480	661616	853440	10348	265	118	63	82
72	984744	454416	233816	296512	3622	271	125	64	81
72	911832	420624	211384	279824	3106	293	135	68	90
72	988136	463888	226744	297504	3430	288	135	66	86
72	1274912	586688	299552	388672	4640	274	126	64	83
72	1161560	542176	271496	347888	4110	282	131	66	84
73	774720	361808	180992	231920	2942	263	122	61	78
73	883696	402208	204304	277184	3288	268	122	62	84
73	1020656	471584	235312	313760	3968	257	118	59	79
73	1030376	477824	238008	314544	4144	248	115	57	75
73	663064	298016	155368	209680	2682	247	111	57	78
74	438760	192976	104872	140912	1750	250	110	59	80
74	606360	269168	143448	193744	2452	247	109	58	79
74	753680	334064	178400	241216	2898	260	115	61	83
74	931744	427536	214240	289968	3502	266	122	61	82
74	994840	443936	237280	313624	3833	259	115	61	81
75	1350296	619264	319144	411888	5148	262	120	61	80
75	1246200	578800	289112	378288	4550	273	127	63	83
75	1207800	559760	280264	367776	4228	285	132	66	86
75	884240	402608	212992	268640	3134	282	128	67	85
75	1296896	590576	304096	402224	4540	285	130	66	88
76	1742776	792816	425624	524336	6252	278	126	68	83
76	1224664	564032	287080	373552	4510	271	125	63	82
76	817688	376000	192360	249328	3032	269	124	63	82
76	2073448	952848	496952	623648	7080	292	134	70	88
76	1376392	638896	317320	420176	4964	277	128	63	84
77	1061408	491152	241584	328672	3964	267	123	60	82
77	784816	347968	182992	253856	3118	251	111	58	81
77	545320	243952	126184	175184	2244	243	108	56	78
77	1002432	448096	236784	317552	3804	263	117	62	83
77	815432	364160	195272	256000	3244	251	112	60	78
78	457472	202272	109152	146048	1866	245	108	58	78
78	776580	339776	189228	247576	3019	257	112	62	82
78	1081656	494288	252760	334608	4092	264	120	61	81
78	1053904	489232	245376	319296	4016	262	121	61	79
78	725512	328384	170808	226320	2822	257	116	60	80
79	617192	279296	144680	193216	2450	251	113	59	78
79	1109952	505584	262496	341872	4178	265	121	62	81
79	1270432	580624	289872	399936	4608	275	126	62	86

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
79	760648	342448	179768	238432	2928	259	116	61	81
79	757688	337488	181112	239088	3110	243	108	58	76
80	715056	316992	168256	229808	2858	250	110	58	80
80	1077656	495136	252008	330512	4080	264	121	61	81
80	1091184	493520	256672	340992	4124	264	119	62	82
80	799072	357664	190832	250576	3186	250	112	59	78
80	1156640	524992	268464	363184	4698	246	111	57	77
81	1254464	575552	287776	391136	4734	264	121	60	82
81	1249752	581088	287032	381632	4396	284	132	65	86
81	1132016	523376	266528	342112	4060	278	128	65	84
81	1185200	534112	287328	363760	4296	275	124	66	84
81	1653864	741936	406984	504944	5802	285	127	70	87
82	1974472	899808	484216	590448	7234	272	124	66	81
82	1561776	702224	384096	475456	5402	289	129	71	88
82	1062688	474544	260112	328032	3834	277	123	67	85
82	824944	377952	195216	251776	2938	280	128	66	85
82	1487320	666128	362088	459104	5534	268	120	65	82
83	1046240	470640	248784	326816	3894	268	120	63	83
83	940384	428656	223408	288320	3696	254	115	60	78
83	907280	412864	210016	284400	3526	257	117	59	80
83	1279888	594848	296560	388480	4976	257	119	59	78
83	1144776	529616	268136	347024	4212	271	125	63	82
84	958040	450816	221560	285664	3496	274	128	63	81
84	1224720	561408	289280	374032	4456	274	125	64	83
84	1677488	758352	398512	520624	6050	277	125	65	86
84	2204024	995632	530056	678336	7862	280	126	67	86
84	1585632	721792	380400	483440	5770	274	125	65	83
85	1689024	765312	410320	513392	6058	278	126	67	84
85	2422744	1092112	583216	747416	8729	277	125	66	85
85	2221768	1008432	538200	675136	8224	270	122	65	82
85	1297320	600208	302984	394128	4786	271	125	63	82
85	1219712	562448	283504	373760	4584	266	122	61	81
86	1344976	629152	310560	405264	4828	278	130	64	83
86	1705680	792960	392912	519808	6318	269	125	62	82
86	1704856	774928	404504	525424	6362	267	121	63	82
86	1192104	538896	282408	370800	4598	259	117	61	80
86	1171600	534096	272000	365504	4516	259	118	60	80
87	1371000	642256	309352	419392	5082	269	126	60	82
87	1391320	651760	313560	426000	5018	277	129	62	84
87	1039168	490880	241712	306576	3724	279	131	64	82

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
87	954944	448304	221920	284720	3338	286	134	66	85
87	1596104	749712	376760	469632	5626	283	133	66	83
88	1195208	563120	283400	348688	4028	296	139	70	86
88	1197600	559312	286784	351504	4166	287	134	68	84
88	1882928	854848	441072	587008	7008	268	121	62	83
88	1841144	848672	429976	562496	6612	278	128	65	85
88	1917776	879728	447152	590896	7304	262	120	61	80
89	1628184	748448	376264	503472	6180	263	121	60	81
89	1057944	483424	243480	331040	4330	244	111	56	76
89	1020720	459616	237872	323232	4178	244	110	56	77
89	1822000	819920	434496	567584	7296	249	112	59	77
89	2096944	917584	520536	658824	7973	263	115	65	82
90	1303632	597360	307728	398544	5218	249	114	58	76
90	1391760	642944	326576	422240	4934	282	130	66	85
90	1566048	731936	360256	473856	5570	281	131	64	85
90	1388512	646640	328688	413184	4882	284	132	67	84
90	946120	442096	223560	280464	3302	286	133	67	84
91	1061024	498240	250832	311952	3786	280	131	66	82
91	1670408	773904	400648	495856	5784	288	133	69	85
91	1890888	880576	450680	559632	6688	282	131	67	83
91	1636584	750720	385752	500112	5874	278	127	65	85
91	1380960	640832	327856	412272	5012	275	127	65	82
92	2078424	935656	506256	636512	7315	284	127	69	87
92	1674488	761664	398808	514016	5942	281	128	67	86
92	1311320	589520	318104	403696	4578	286	128	69	88
92	1122960	504752	270400	347808	4208	266	119	64	82
92	1618272	716208	398768	503296	5564	290	128	71	90
93	1419856	652832	335808	431216	4976	285	131	67	86
93	1568976	711552	378880	478544	5654	277	125	67	84
93	1299344	599952	312464	386928	4808	270	124	64	80
93	2452408	1094096	609256	749056	8644	283	126	70	86
93	2389384	1071808	589208	728368	8282	288	129	71	87
94	1742952	804080	418008	520864	6112	285	131	68	85
94	1488672	685856	353728	449088	5000	297	137	70	89
94	1817240	826736	435128	555376	6672	272	123	65	83
94	1979360	884496	483888	610976	7164	276	123	67	85
94	1925160	880464	459416	585280	7040	273	125	65	83
95	1791408	801536	437120	552752	6600	271	121	66	83
95	2482444	1091232	610012	781200	9268	267	117	65	84
95	1506080	671088	362752	472240	5714	263	117	63	82

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
95	998952	457808	231256	309888	3898	256	117	59	79
95	1390944	608432	346816	435696	5148	270	118	67	84
96	949896	429328	229208	291360	3654	259	117	62	79
96	1173288	531696	278088	363504	4662	251	114	59	77
96	1510856	705440	354408	451008	5462	276	129	64	82
96	1558504	713968	377672	466864	5626	277	126	67	82
96	1070416	494592	258688	317136	3972	269	124	65	79
97	1102784	509104	261296	332384	4040	272	126	64	82
97	1451192	668720	348856	433616	5366	270	124	65	80
97	1457576	663056	352120	442400	5390	270	123	65	82
97	1456648	658496	352936	445216	5444	267	120	64	81
97	1191024	536352	295376	359296	4482	265	119	65	80
98	1949840	867232	481760	600848	7244	269	119	66	82
98	1521888	695472	366352	460064	5566	273	124	65	82
98	1445640	666912	344056	434672	5264	274	126	65	82
98	1481544	678976	351352	451216	5668	261	119	61	79
98	1410768	643760	336208	430800	5370	262	119	62	80
99	1696048	786112	399760	510176	6426	263	122	62	79
99	1052296	486080	247672	318544	3928	267	123	63	81
99	803376	376512	189168	237696	2940	273	128	64	80
99	1507280	687072	363072	457136	5798	259	118	62	78
99	1184448	556880	273680	353888	4438	266	125	61	79
100	2643576	1180928	649192	813456	10114	261	116	64	80
100	1559296	716640	367424	475232	5906	264	121	62	80
100	2807208	1238640	690936	877632	10708	262	115	64	81
100	2207168	979488	543984	683696	8226	268	119	66	83
100	2158720	969744	529888	659088	7980	270	121	66	82
101	1207200	552816	282688	371696	4458	270	124	63	83
101	1004616	463744	234360	306512	3910	256	118	59	78
101	1312256	596848	309664	405744	5092	257	117	60	79
101	1724080	778864	421424	523792	6376	270	122	66	82
101	1325440	613616	312128	399696	4986	265	123	62	80
102	1769520	798928	424224	546368	6660	265	119	63	82
102	1665440	749904	404992	510544	6328	263	118	64	80
102	1441400	666496	336824	438080	5292	272	125	63	82
102	1402216	649280	330344	422592	5042	278	128	65	83
102	1270760	594976	303080	372704	4832	262	123	62	77
103	962424	446928	225544	289952	3638	264	122	61	79
103	1116792	519328	256248	341216	4192	266	123	61	81
103	1460048	683776	335088	441184	5562	262	122	60	79

Zeit	Gesamt	Rotanteil	Grünanteil	Blauanteil	Pixel	RGB/Pixel	Rot/Pixel	Grün/Pixel	Blau/Pixel
103	1729672	805392	405848	518432	6446	268	124	62	80
103	1914912	872976	452576	589360	7328	261	119	61	80
104	2268308	1034128	537524	696656	8660	261	119	62	80
104	2491272	1131888	600984	758400	9150	272	123	65	82
104	2527040	1136832	612208	778000	9260	272	122	66	84
104	1574272	712944	378096	483232	5974	263	119	63	80
104	1811424	823728	429984	557712	6548	276	125	65	85
105	1460488	676368	340216	443904	5460	267	123	62	81
105	1110400	516704	253680	340016	4184	265	123	60	81
105	1131752	525440	256024	350288	4358	259	120	58	80
105	2484348	1105432	601412	777504	9998	248	110	60	77
105	2025332	915952	474068	635312	8066	251	113	58	78
106	1389216	638800	320592	429824	5302	262	120	60	81
106	1217184	564576	278336	374272	4456	273	126	62	83
106	1079892	493872	257532	328488	4027	268	122	63	81
106	1950496	885744	462528	602224	7706	253	114	60	78
106	1897544	872640	449704	575200	7292	260	119	61	78
107	2628840	1172176	638920	817744	9686	271	121	65	84
107	1235664	565392	285472	384800	4740	260	119	60	81
107	1229472	552112	294976	382384	4858	253	113	60	78
107	1190000	542784	273456	373760	4684	254	115	58	79
107	1668392	760512	394520	513360	6480	257	117	60	79
108	1123128	509280	266264	347584	4184	268	121	63	83
108	1010024	465312	233368	311344	3792	266	122	61	82
108	1503616	694576	347424	461616	5526	272	125	62	83
108	1693856	790496	400448	502912	6294	269	125	63	79
108	4488492	2029696	1085420	1373376	16565	270	122	65	82
109	3201600	1433936	776512	991152	12082	264	118	64	82
109	2211688	977904	545496	688288	8176	270	119	66	84
109	1395304	630976	337096	427232	5220	267	120	64	81
109	1174600	534256	274632	365712	4408	266	121	62	82

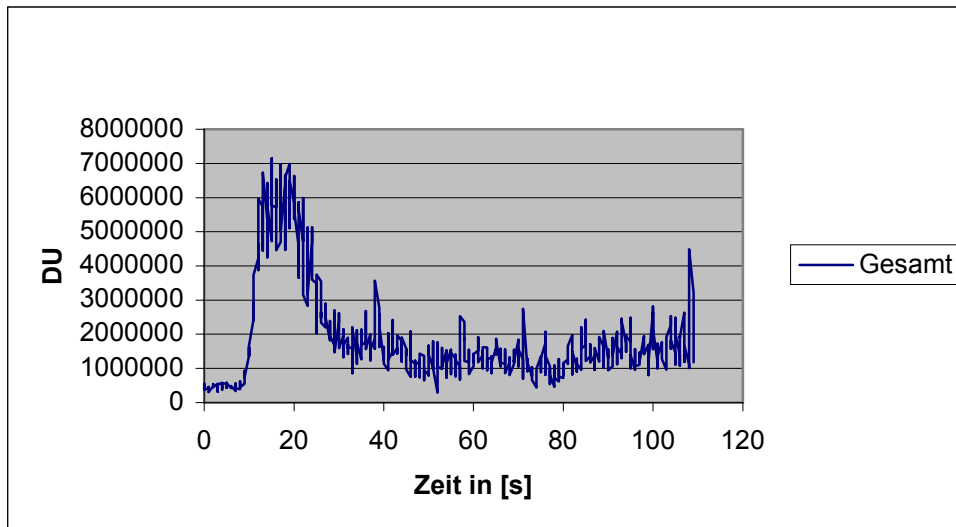


Abbildung 12: Zeit-Intensitätskurve aus diesem Datensatz

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

- Gemäß der Habilitationsordnung der Charité
Hiermit erkläre ich, daß
keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst
gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen
Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur
vollständig angegeben sind,
dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den

Dr. Jens-Uwe Blohmer

Dank

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Werner Lichtenegger, Geschäftsführender Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité, für seine wohlwollende Unterstützung und kritische Begleitung der wissenschaftlichen Untersuchungen und klinischen Arbeiten dieser Arbeit.

Unter seiner Leitung entwickelte sich die Frauenklinik im Campus Charité Mitte zu einem national und international beachteten Zentrum für die Diagnostik und Behandlung des Mammakarzinoms.

Unter dem emeritierten und zu früh verstorbenen Direktor der Universitätsfrauenklinik der Charité, Herrn Professor Dr. med. habil. Hans-Ulrich Lau, begannen meine ersten Schritte zur Untersuchung von Durchblutung und Vaskularisation der Mammakarzinome. Er hat mich ebenso wie Herr Prof. Dr. med. Rainer Bollmann ermuntert, auf diesem Gebiet wissenschaftlich zu arbeiten. Beide haben die technischen Voraussetzungen geschaffen und mir das notwendige Rüstzeug für die wissenschaftliche Bearbeitung des Themas vermittelt, wofür ich mich besonders bedanke.

Mein Dank für die vielfältige Unterstützung bei den klinischen, experimentellen und histologischen Untersuchungen geht besonders an:

- meine Kollegen der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe:
Dr. Stefan Paepke, Dr. Lutz Kissner, Frau Dr. Christine Hüttner, Frau Dr. Ingrid Kaufmann,
die Kollegen aus der Strahlenklinik und Poliklinik der Charité: Dr. Hans Oellinger, Dr. Carsten Siewert,
die Kollegen aus dem Pathologischen Institut der Charité: Frau Dr. Barbara Fleige, Frau Ulrike Schneider, Dr. Peter Hufnagl,
die Mitarbeiter aus der Abteilung Ultraschallkontrastmittel der Schering AG: Dr. Thomas Fritsch, Michael Reinhardt,
meine Doktoranden: Frau Dr. Birgit Kraeft, geb. Hruby, Frau Dr. Cornelia Schmidt, Frau Yvonne Grineisen, Frau Annegret Gohlke, Frau Daniela Laubersheimer, Peter Hieke, Jan Schmidt.

Berlin, im Oktober 1999

Dr. Jens-Uwe Blohmer